

Treball de Fi de Grau
Enginyeria Química

Les fulles de *Morinda Citrifolia* com antioxidant natural

MEMÒRIA

Autor:

Meritxell Ballester Armengol

Director/s:

Maria Pilar Almajano

Convocatòria:

Juny 2016



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



Resum

En aquest treball s'analitza la capacitat antioxidant de les fulles del noni (*Morinda Citrifolia*) en diversos *food models*.

La mostra amb la que es realitzen tots els experiments es originària de Sud Amèrica. Primerament es quantifica l'activitat antiradicalària a partir de diversos mètodes (contingut de polifenols, en front del radical AAPH pel mètode ORAC i dels radical ABTS i DPPH) de les fulles obtingudes tant de Veneçuela com de Mèxic.

La mostra obtinguda de Veneçuela ha estat àmpliament analitzada. La determinació de l'oxidació primària es realitza pel mètode del valor peròxid i la de l'oxidació secundària pel mètode del *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS). També s'ha posat a punt el grau d'oxidació a través de la espectroscòpia infraroja.

En tots els experiments s'ha complert que la protecció a l'oxidació es proporcional a les concentracions dels antioxidants afegits.

En les emulsions o/w, l'extracte de noni al 5,8% protegeix 3 vegades més de l'oxidació que la mostra control. En l'experiment amb carn de vedella, el film de gelatina fabricat amb noni liofilitzat mostra més efectivitat que el film de PLA també amb noni liofilitzat. El film de gelatina-noni així com els films de PEBD (Polietilè de baixa densitat) activat amb un concentrat de noni, protegeixen 1,7 vegades més de l'oxidació que la mostra control. Hi ha un comportament similar en l'experiment amb peix, on el noni afegit directament en un percentatge del 5% protegeixen 6 vegades més de l'oxidació que la mostra control.

L'anàlisi amb espectroscòpia infraroja mostra també com el noni protegeix la mostra front l'oxidació mitjançant l'estudi de les bandes específiques de l'espectre disminució de la banda de èster i increment de la banda de carboxil.

Aquest treball demostra per tant que les fulles del noni poden ser un bon substitut dels antioxidants sintètics en la indústria alimentària.

Sumari

RESUM	1
SUMARI	2
1 GLOSSARI	5
2 OBJECTIUS	6
3 INTRODUCCIÓ.....	7
3.1 Contextualització del problema	7
3.2 Antioxidants	8
3.2.1 L'autooxidació	8
3.2.2 Inhibició de l'oxidació dels greixos.....	8
3.2.3 Factors que intervenen en l'oxidació dels lípids	9
3.2.4 Classificació dels antioxidants.....	9
3.3 Descripció dels antecedents.....	11
3.4 Quantificació de l'activitat antioxidant	14
3.4.1 Mètode de Folin-Ciocalteu	14
3.4.2 Mètode del ABTS.....	14
3.4.3 Assaig ORAC	15
3.4.4 Assaig DPPH.....	16
3.5 Noni (<i>Morinda Citrifolia</i>).....	17
3.5.1 Descripció de la planta	17
3.5.2 Composició química.....	17
3.5.3 Contingut d'aigua.....	17
3.6 Mètodes per determinar el grau d'oxidació	18
3.6.1 Valor de peròxid.....	18
3.6.2 TBARS	18
3.6.3 Espectroscòpia IR	18
3.6.3.1 Equips d'espectroscòpia IR	19
3.6.3.2 Freqüències estudiades	22
4. MATERIAL I MÈTODES.....	23
4.1 Material i reactius.....	23
4.1.1 Aparells i material	23
4.1.2 Reactius	23
4.2 Planta	23

4.3	Aliments	23
4.4	Preparació d'extractes	23
4.5	Fabricació dels films.....	24
4.5.1	Film de PLA	24
4.5.2	Film de gelatina-Noni	24
4.6	Mètode de Folin-Ciocalteau	24
4.7	Mètode del ABTS.....	25
4.8	Assaig ORAC	25
4.9	Assaig DPPH.....	26
4.10	Eliminació d'antioxidants naturals de l'oli de gira-sol.....	26
4.11	Valor de peròxid.....	27
4.12	Condicionament de les meat-burg.....	27
4.13	TBARS per a les meat-burg i fish-burg	28
4.14	Espectroscòpia IR	28
4.14.1	Extracció del greix de les sardines	28
4.14.2	Espectrofotòmetre d'infraroig FTIR amb ATR.....	29
5.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	30
5.1	Esquema global dels experiments.....	30
5.2	Estudi previ de l'extracte	31
5.2.1	Prova del TPC.....	31
5.2.2	Prova del ORAC	31
5.2.3	Prova del ABTS	32
5.2.4	Prova del DPPH.....	32
5.2.5	Correlació entre els diferents mètodes d'activitat antiradicalària.....	33
5.3	Experiments.....	34
5.3.1	EXPERIMENT nº1, previ: Films de PLA i Gelatina en meat-burg	35
5.3.1.1	Resultats	35
5.3.1.2	Millores	35
5.3.2	EXPERIMENT nº2: Films de Gelatina i PEBD en meat-burg.....	36
5.3.2.1	Condicions de l'experiment.....	36
5.3.2.2	Resultats	36
5.3.2.3	Canvis en el color	37
5.3.3	EXPERIMENT nº3: Emulsions o/w	38
5.3.3.1	Resultats VP.....	38

5.3.3.2	Evolució del pH	39
5.3.3.3	Anàlisi estadístic	39
5.3.4	EXPERIMENT nº4: Pols de noni en fish-burg.....	40
5.3.4.1	Condicion de l'experiment.....	40
5.3.4.2	Resultats	40
5.3.5	EXPERIMENT nº5: Espectroscòpia IR del greix de sardines	42
5.3.5.1	Resultats	42
6.	COST DEL PROJECTE	45
6.1	Reactius.....	45
6.2	Aliments.....	45
6.3	Material	46
6.4	Amortització aparells	46
6.5	Personal	47
6.6	Total	47
7.	IMPACTE AMBIENTAL	48
8.	DESENVOLUPAMENT TEMPORAL DEL TREBALL.....	49
	CONCLUSIONS	50
	AGRAÏMENTS	51
	BIBLIOGRAFIA	52

1 Glossari

AAO: Activitat antioxidant

ABTS: 2'2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulonic acid)

APPH: 2,2-Azobis (2-metilpropinamida) dihidroclorur

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidroxitoluè

DAD: *Diode Array*

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracil

EDTA: Etilè Diamina Tetra Acetat

MC: *Moisture Content*

MDA: Malondialdehid

Milli-Q: Aigua bidestil·lada

MIR: *Middle InfraRed*

NIR: *Near InfraRed*

ORAC: *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*

PEBD: Polietilè de baixa densitat

RSA: *Radical Scavenging Activity*

TBA: Àcid tiobarbitúric

TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TBHQ: Terbutil hidroquinona

TCA: Àcid tricloroacètic

TPC: *Total Phenolic Content*

VP: Valor Peròxid

2 Objectius

L'objectiu d'aquest projecte és avaluar la capacitat antioxidant de les fulles de noni tant "*in vitro*" com en diferents aliments.

En aquest projecte hi ha els següents objectius parcials:

- Extreure els compostos bioactius de les fulles de noni i preparar un liofilitzat.
- Preparar diferents tipus de film "actiu" amb l'extracte hidroetanòlic.
- Mesurar l'endarreriment de l'oxidació en hamburgueses de carn quan es cobreixen amb films de gelatina de noni.
- Analitzar la capacitat antioxidant de l'extracte de noni en emulsions d'o/w.
- Mesurar la protecció a l'oxidació del pols de noni en sardines triturades.
- Avaluar el procés oxidatiu de les hamburgueses de peix amb la espectroscòpia IR.

3 Introducció

3.1 Contextualització del problema

Hi ha diverses maneres de deteriorament dels aliments segons les causes que provoquen dites alteracions. Les més importants són les causes químiques i biològiques. Són de gran importància no solament per la freqüència amb la que intervenen en els processos de deteriorament dels aliments, sinó també, i particularment, perquè els processos d'alteració que provoquen impliquen, en pràcticament la majoria dels casos, la destrucció de tot el producte.

Dins les causes biològiques, les més importants són les produïdes pels enzims naturals dels aliments i les causades pels microorganismes.

Dins les causes químiques, existeixen dues particularment importants: l'enfosquiment no enzimàtic (provocat per certs processos tecnològics o per l'emmagatzematge dels aliments) i l'enranciment oxidatiu dels greixos, problemàtica que és l'objecte d'estudi d'aquest treball [1].

L'oxidació dels greixos és una de les principals causes de deteriorament químic dels aliments. La seva conseqüència organolèptica més important és l'aparició d'olors i sabors desagradables, fent que l'aliment sigui inacceptable pel consumidor i reduint o limitant la seva vida útil. A més l'oxidació dels greixos pot reduir el valor nutritiu dels aliments i fins i tot, alguns dels productes de l'oxidació són potencialment tòxics [1],[2].

L'oxidació dels greixos és un procés complex que implica nombroses reaccions que donen lloc a una gran varietat de canvis físics i químics. Tot i que sembla que les reaccions segueixin un model ordenat, la majoria de les vegades es produeixen simultàniament i de manera competitiva. Per estudiar aquestes reaccions es divideixen en tres etapes: iniciació, propagació i finalització [3].

Els antioxidants són compostos que endarrereixen el fenomen de la oxidació dels greixos. N'hi ha de naturals i de sintètics. Els sintètics són molt utilitzats per les indústries alimentàries degut a la seva estabilitat, eficàcia i avantatge econòmic però son objecte d'estudi perquè podrien tractar-se de compostos poc beneficiosos per a la salut humana. És per això que els antioxidants naturals podrien esdevenir-ne la solució i es treballa en la substitució dels sintètics pels naturals.

Els antioxidants naturals provenen sovint de les diferents parts de les plantes: fulles, flor, llavor o fruit. D'aquests se n'aprofiten les parts no consumides com aliment les quals també són riques en compostos antioxidants i s'afegeixen als aliments com additius.

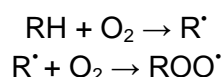
Les emulsions i els experiments amb carn i peix són *food models* molt acceptats per avaluar el poder antioxidant dels residus vegetals i avaluar el procés d'oxidació al llarg del temps. D'altres tècniques com ara l'espectroscòpia IR també permeten veure l'evolució de l'oxidació en el temps. Aquest projecte es centrarà en l'avaluació del poder antioxidant del Noni mitjançant els *food models* i l'espectroscòpia IR [4].

3.2 Antioxidants

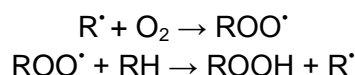
3.2.1 L'autooxidació

Les reaccions d'autooxidació o oxidació dels greixos segueixen el mecanisme de reacció següent:

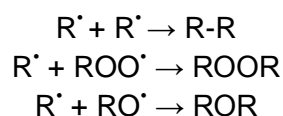
- Iniciació: En la primera fase es formen els radicals lliures R^\bullet a partir dels àcids grassos insaturats (RH) per combinació amb l'oxigen. Aquests radicals lliures R^\bullet amb l'excés d'oxigen atmosfèric reaccionen donant lloc a radicals peròxids ROO^\bullet .



- Propagació (reacció encadenada): Es van acumulant peròxids. Els radicals lliures R^\bullet segueixen reaccionant amb l'oxigen produint radicals peròxid ROO^\bullet i aquests a la seva vegada reaccionen amb els lípids insaturats RH donant lloc a hidroperòxids i radicals lliures.

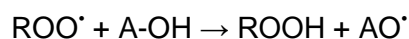


- Terminació: Els radicals lliures R^\bullet procedents de la descomposició dels radicals peròxid es combinen entre ells donant lloc a altres compostos com ara aldehids, cetones o àcids grassos de cadena curta que donen l'olor a ranci. En aquestes condicions la reacció acaba [3].



3.2.2 Inhibició de l'oxidació dels greixos

Els antioxidants són capaços de competir amb els àcids grassos pels radicals peròxids cedint el seu hidrogen del seu grup hidroxil. D'aquesta manera bloquegen el radical peròxid i es forma un nou radical més estable ja que l'electró està deslocalitzat en l'anell benzènic de l'antioxidant. És així com són capaços d'aturar temporalment la reacció en cadena de la propagació.



Una acció característica dels antioxidants es que provoquen un període de latència o període d'inducció (PI) el qual es habitualment d'una duració proporcional a la concentració d'antioxidant i es manté fins que el 90% de l'antioxidant ha estat destruït. Durant aquest període de latència la peroxidació dels àcids grassos es produeix a una velocitat molt lenta, però finalment progressa a una velocitat igual o inclús superior a la dels lípids no protegits [3].

3.2.3 Factors que intervenen en l'oxidació dels lípids

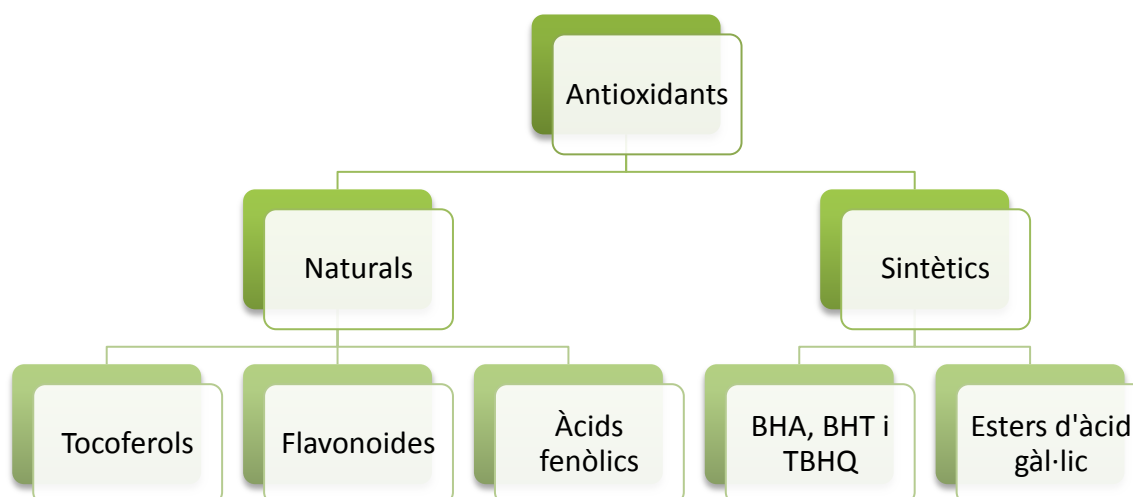
Taula 1. Factors que intervenen en l'oxidació dels lípids

FACTOR	COM INTERVÉ
Quantitat d'oxigen present	En atmosferes riques en oxigen s'acceleren les reaccions d'oxidació
Exposició a la llum	Accelera les reaccions d'oxidació
Temperatura d'emmagatzematge	Com més alta sigui major velocitat de reacció hi ha

3.2.4 Classificació dels antioxidants

Segons el seu origen tenim:

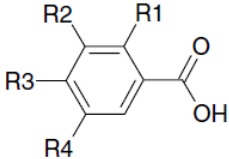
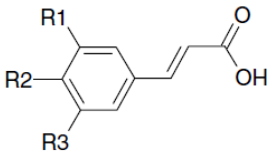
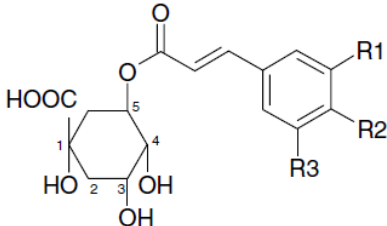
- **Sintètics:** Els antioxidants sintètics són aquells que l'home ha modificat químicament. Són els més utilitzats degut al seu alt grau d'estabilitat, eficàcia i avantatge econòmic. El BHA, el BHT, la TBHQ i els esters d'àcid gàl·lic són els principals compostos utilitzats a la indústria alimentària d'origen sintètic. L'ús d'aquests antioxidants està limitat a 0,02 % del contingut d'oli o greix de l'aliment.
- **Naturals:** Els antioxidants naturals són aquells que s'obtenen directament de la natura, sense cap transformació. La seva acció antioxidant es troba, normalment correlacionada amb el contingut de compostos fenòlics que actuen com acceptadors de radicals lliures.



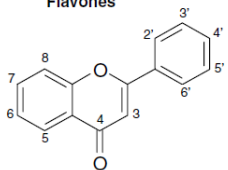
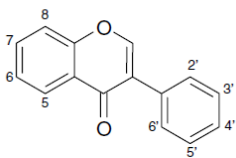
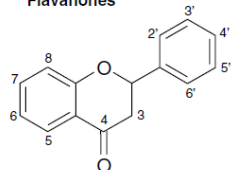
Imatge 1. Classificació dels antioxidants

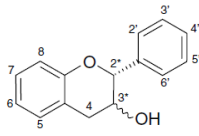
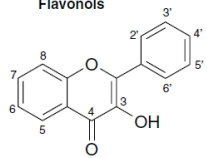
Els antioxidants naturals es poden classificar segons el seu grup principal i dona lloc a tres tipus: els tocoferols, els flavonoides i els àcids fenòlics [4],[5].

Taula 2. Estructures químiques dels àcids fenòlics [6]

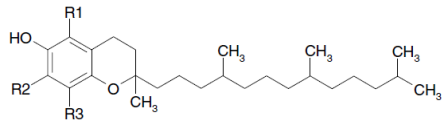
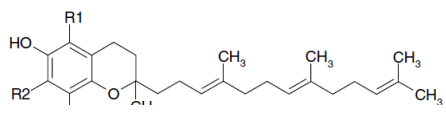
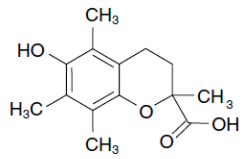
ÀCIDS FENÒLICS	
<p>Hydroxybenzoic acids</p>  <p> R1=R2=R3=R4=H Benzoic acid (non phenolic) R1=R4=H, R2=R3=OH Protocatechic acid R1=H, R2=R3=R4=OH Gallic acid R1=OH, R2=R3=R4=H Salicylic acid R1=R4=OH, R2=R3=H Gentisic acid </p>	<p>Hydroxycinnamic acids</p>  <p> R1=R2=R3=H Cinnamic acid (non phenolic) R1=R3=H, R2=OH <i>p</i>-Coumaric acid R1=R2=OH, R3=H Caffeic acid R1=OCH₃, R2=OH, R3=H Ferulic acid R1=R3=OCH₃, R2=OH Sinapic acid </p>
<p>Hydroxycinnamates (Chlorogenic acids)</p>  <p> R1=R2=OH, R3 Caffeoyl quinic acid R1=R3=H, R2=OH <i>p</i>-Coumaroyl quinic acid R1=OCH₃, R2=OH, R3=H Feruloyl quinic acid R1=R3=OCH₃, R2=OH Sinapoyl quinic acid </p>	

Taula 3. Estructures químiques dels flavonoides [6]

FLAVONOIDES		
<p>Flavones</p>  <p> Apigenin : 5=7=4'=OH Luteolin : 5=7=3'=4'=OH Diosmetin : 5=7=3'=OH, 4'=OCH₃ Isovitexin : 5=7=4'=OH, 6=Glucose </p>	<p>Isoflavones</p>  <p> Daidzein : 7=4'=OH Genistein : 5=7=4'=OH </p>	<p>Flavanones</p>  <p> Naringenin : 5=7=4'=OH Hesperitin : 5=7=3'=OH, 4'=OCH₃ Naringin : Naringenin-7-neohesperidoside Hesperidin : Hesperitin-7-rutinoside </p>

FLAVONOIDES		
<p>Flavanols</p>  <p>Catechin (2'R, 3'S) : 5=7=3'=4'=OH Epicatechin (2'R, 3'R) : 5=7=3'=4'=OH Epigallocatechin (2'R, 3'R) : 5=7=3'=4'=5'=OH Epicatechin gallate (2'R, 3'R) : 5=7=3'=4'=OH, 3-gallic acid ester Epigallocatechin gallate (2'R, 3'R) : 5=7=3'=4'=5'=OH, 3-gallic acid ester</p>	<p>Flavonols</p>  <p>Kaempferol : 5=7=4'=OH Quercetin : 5=7=3'=4'=OH Morin : 5=7=2'=4'=OH Fisetin : 7=3'=4'=OH Myricetin : 5=7=3'=4'=5'=OH</p>	<p>Anthocyanidins</p> <p>Pelargonidin : 5=7=4'=OH Cyanidin : 5=7=3'=4'=OH Delphinidin : 5=7=3'=4'=5'=OH Malvidin : 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH₃</p> <p>Anthocyanins</p> <p>Cyanidin 3-glucoside Cyanidin 3-galactoside Cyanidin 3-rutinoside Malvidin 3-glucoside</p>

Taula 4. Estructures químiques dels tocoferols [6]

TOCOFEROLS	
<p>Tocopherols</p>  <p>Tocotrienols</p>  <p> $R_1=R_2=R_3=CH_3$ α $R_1=R_3=CH_3, R_2=H$ β $R_1=H, R_2=R_3=CH_3$ γ $R_1=R_2=H, R_3=CH_3$ δ </p>	<p>Trolox</p> 

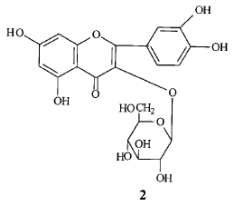
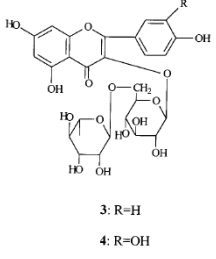
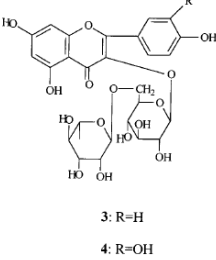
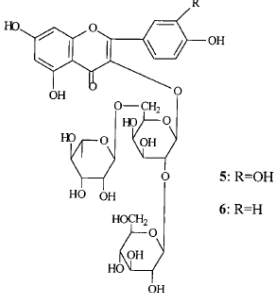
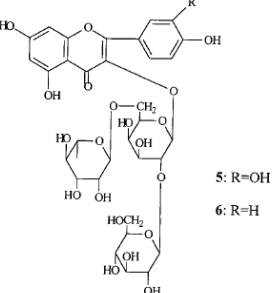
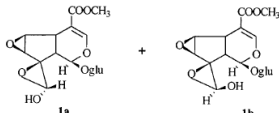
3.3 Descripció dels antecedents

No és la primera vegada que s'estudia l'espècie *Morinda Citrifolia*. Estudis anteriors ja han descrit les seves propietats antioxidants fent-ne estudis de diferents parts d'aquesta planta.

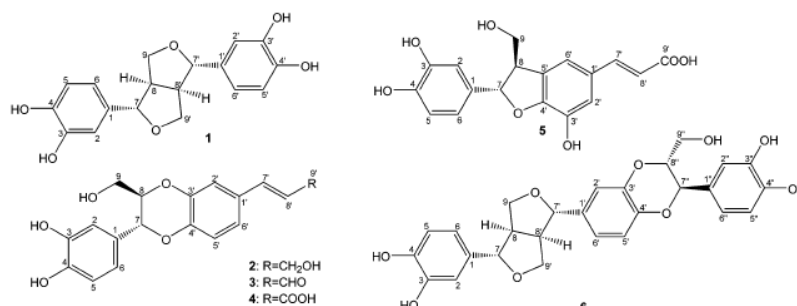
J.Yang (2006) estudia el suc i la pols de la fruita del noni. Es realitzen els mètodes del DPPH i el TPC. En els resultats s'aprecia una disminució de l'activitat antioxidant al llarg dels dies de fermentació així com en els dies d'emmagatzematge. L'estudi conclou que tant els fenols totals com l'activitat de captació de radicals lliures es veu afectada negativament amb l'emmagatzematge i en processos fermentatius [7].

També s'han identificat alguns compostos orgànics que contenen les fulles del noni. En l'article de S. Sang (2001) s'identifiquen 5 compostos coneguts i un de desconegut mitjançant HPLC amb DAD [8]. Els compostos són:

Taula 5. Compostos orgànics de la *Morinda Citrifolia*

 <p style="text-align: center;">2</p>	<p style="text-align: center;">Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside</p>
 <p style="text-align: center;">3: R=H 4: R=OH</p>	<p style="text-align: center;">Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside</p>
 <p style="text-align: center;">3: R=H 4: R=OH</p>	<p style="text-align: center;">Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside</p>
 <p style="text-align: center;">5: R=OH 6: R=H</p>	<p style="text-align: center;">Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-galacopyranoside</p>
 <p style="text-align: center;">5: R=OH 6: R=H</p>	<p style="text-align: center;">Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-galacopyranoside</p>
 <p style="text-align: center;">1a 1b</p>	<p style="text-align: center;">Citrifolinoside B (1a + 1b)</p>

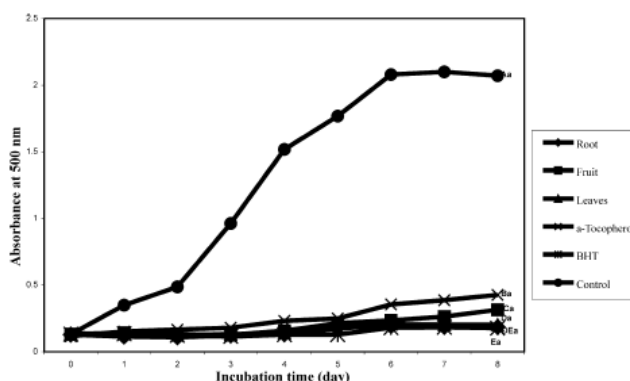
K.Kamiya (2004) també es troben compostos naturals de la *Morinda Citrifolia*: 3,3-Bisdemethylpinoresinol (1), Americanol A (2), Americanin A (3), Americanoic acid A (4), Morindolin (5), Isoprincepin (6): [9]



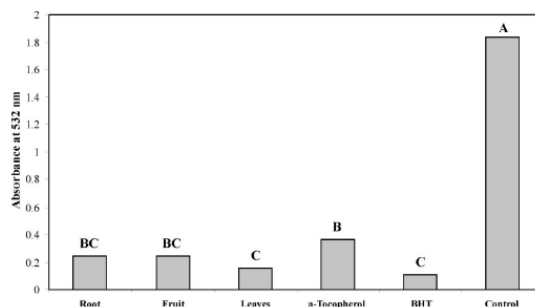
Imatge 2. Compostos orgànics de la *Morinda Citrifolia*

En l'article de Y.Y.Thoo (2009) [10] s'analitza el fruit del noni. S'utilitzen els mètodes del TPC, del DPPH i de l'ABTS. En els resultats s'estudia quin és la millor concentració de dissolvent per a realitzar l'extracció, quin és el temps òptim per a l'extracció i quina és la temperatura òptima d'extracció tots tres paràmetres segons el mètode aplicat. S'analitza estadísticament pel mètode de Superfície de Resposta. L'estudi conclou que les condicions òptimes són: concentració del 40% d'etanol, durant 80min a 65°C. En el present treball les condicions de treball també seran amb dissolvent polar (etanol) però la temperatura d'extracció serà inferior degut a que alguns dels polifenols que conté el noni són sensibles a elevades temperatures.

En l'article de Z.M. Zin (2001) [11] tracten amb la fulla, el fruit i les arrels de la *Morinda Citrifolia*. Avaluen la prova del FTC, i la prova del TBA per dos dissolvents diferents en l'extracte: un polar (metanol) i un apolar (acetat d'etil). En la prova del FTC es veu com el dissolvent apolar ajuda a endarrerir l'oxidació de la mostra al llarg del temps. Les mateixes conclusions se n'extreuen de la prova del TBA. El substrat utilitzat en l'article és l'àcid linoleic.



Imatge 3. Gràfic de la prova del FTC per a l'extracte d'acetat d'etil



Imatge 4. Gràfic de la prova del TBA per a l'extracte d'acetat d'etil

Z.M. Zin (2004) [12] es preparen extractes de la fulla, l'arrel i la fruita del noni. S'avalua el TPC, TBA i el FTC de les fraccions obtingudes per cromatografia de columna. Els resultats mostren que totes les fraccions (de fruita, arrel i fulla) presenten alta activitat antioxidant comparades inclús amb antioxidants reconeguts com el BHT o l'α-tocoferol.

3.4 Quantificació de l'activitat antioxidant

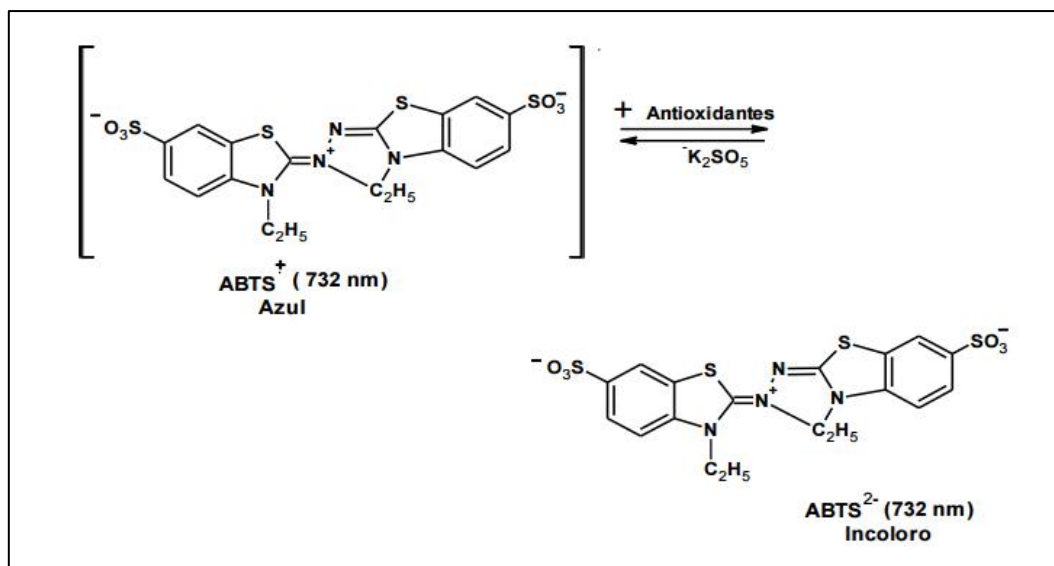
La quantificació de l'activitat antioxidant d'alguns aliments o extractes dona informació referent a l'efecte sinèrgic que es pot produir a causa de les interaccions de diferents espècies antioxidants presents. Aquesta capacitat antioxidant normalment és superior a la suma de les capacitats antioxidants individuals. D'aquí que es parli d'efecte sinèrgic.

3.4.1 Mètode de Folin-Ciocalteu

És un assaig àmpliament utilitzat per mesurar el contingut de compostos fenòlics totals (TPC) en productes naturals, tot i tenir un mecanisme de reacció redox bàsica. L'oxidació dels fenols presents a la mostra causa l'aparició d'una coloració blavosa que presenta un màxim d'absorció a 765nm i que es quantifica per espectrofotometria en base a una recta patró, per exemple, d'àcid gàl·lic. Per tant, aquest mètode proporciona informació valuosa a l'hora de seleccionar varietats amb major potencial antioxidant [13].

3.4.2 Mètode del ABTS

El mètode del ABTS es determina seguint el procediment de A.B Costa (2013) amb petites modificacions [14]. En aquest mètode s'avalua la capacitat que té l'antioxidant de reaccionar amb el radical lliure $ABTS^+$ per formar el complex $ABTS^{2-}$.



Imatge 5. Reacció del radical ABTS amb l'antioxidant [15]

3.4.3 Assaig ORAC

L'assaig ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) es realitza seguint el procediment descrit per Y.C.Blanco (2007) [16]. Aquest consisteix en la quantificació de la capacitat antiradicalària mitjançant la inhibició de l'atac a la fluoresceïna per part del radical AAPH (Adriana Barbosa Costa, 2013).

Els valors obtinguts són les àrees de sota les corbes de fluoresceïna, aproximades pel mètode de trapezis.

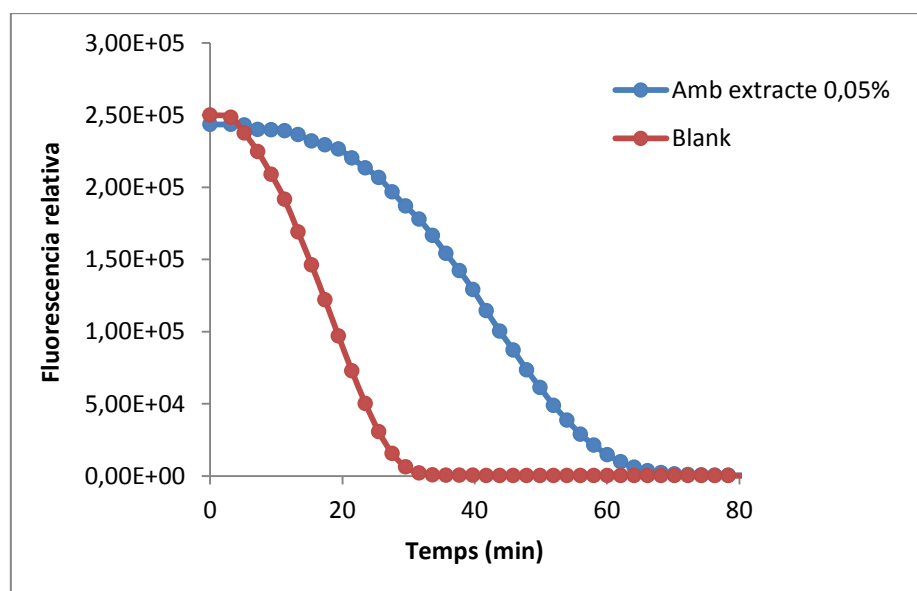


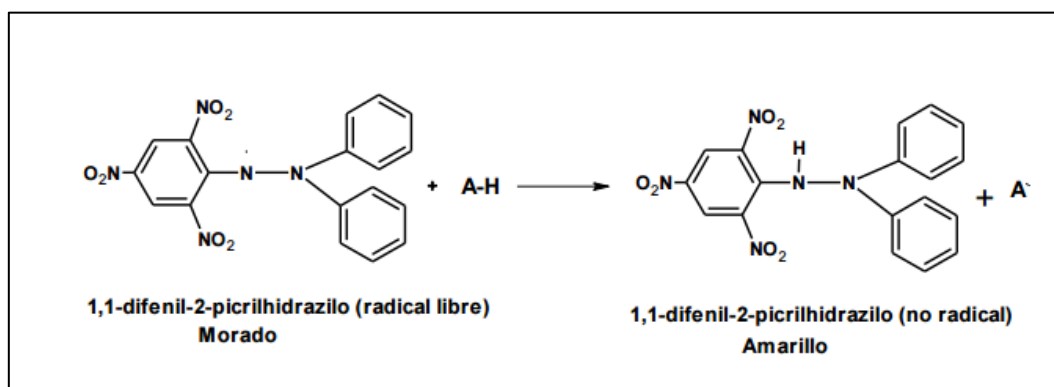
Figura 1. Corva característica de l'assaig ORAC per una mostra amb i sense extracte

3.4.4 Assaig DPPH

La capacitat de captació de radicals lliures es va mesurar utilitzant el radical lliure 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) segons el mètode proposat prèviament per B.Williams (1995) [17]. Per al càlcul de la capacitat de captació de radicals lliures es troba el percentatge d'inhibició del DPPH. Aquest es calcula:

$$\% \text{ Inhibició DPPH} = \frac{\text{Abs}(\text{temps } 0) - \text{Abs}(\text{temps actual})}{\text{Abs}(\text{temps } 0)} \cdot 100$$

A més temps major és la inhibició del radical DPPH ja que ha reaccionat més radical. A més concentració d'antioxidant major també és la inhibició d'aquest radical ja que més H provinents de l'antioxidant hauran reaccionat amb el radical lliure DPPH.



Imatge 6. Reacció entre el radical DPPH i l'antioxidant [15]

3.5 Noni (*Morinda Citrifolia*)

El noni es una fruita originària del sud-est asiàtic i es cultiva en zones de clima tropical com ara la Polinèsia, la Índia, el Carib, Mèxic, Amèrica Central i part d'Amèrica del Sud. Les mostres concretament són de Veneçuela i Veracruz. El noni s'utilitza tant en aliments com en fàrmacs. Normalment se'n consumeix el suc de la fruita però també s'utilitzen les fulles, les flors i l'arrel. És coneguda com una planta amb alt potencial antioxidant [5].

3.5.1 Descripció de la planta

És un arbust de 3 a 10 m d'altura amb abundants fulles amples el·líptiques. El fruit és ovalat de color blanc quan es cull amb una closca i protuberàncies amb llavors. El fruit madur desprèn una olor forta a ranci i la polpa és sucosa i amarga, de color groc opac o blanc i aspecte gelatinós la qual presenta nombroses cavitats triangulars de color marró-roig que contenen quatre llavors.

3.5.2 Composició química

S'han identificat aproximadament 140 compostos en la planta del Noni. Els principals són compostos fenòlics, àcids orgànics i alcaloides.



Imatge 7. Detall de la fulla del Noni

3.5.3 Contingut d'aigua

Per a saber el contingut d'aigua pesem la fulla a temps zero, quan aquesta està fresca i a temps final quan ja s'ha assecat completament i dona pes constant.

El contingut en aigua es calcula seguint la següent equació:

$$\% MC = \frac{\text{pes ini.}(g) - \text{pes fi.}(g)}{\text{pes ini.}(g)} \cdot 100 = \frac{6,234 - 1,221}{6,234} \cdot 100 = 80,4\%$$

3.6 Mètodes per determinar el grau d'oxidació

Hi ha un gran nombre de mètodes per valorar el grau d'oxidació dels greixos. No obstant, cap d'ells per si sols poden mesurar totes les reaccions d'oxidació alhora ni totes les etapes del procés d'oxidació.

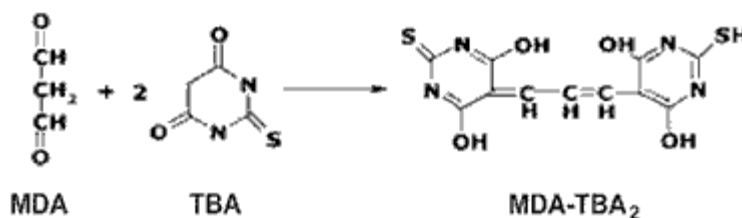
En aquest projecte s'ha utilitzat el VP, TBARS i l'espectroscòpia IR que es descriuen a continuació.

3.6.1 Valor de peròxid

El valor de peròxid és un mètode químic molt freqüent per mesurar el deteriorament oxidatiu dels greixos en les primeres etapes d'aquesta reacció (oxidació primària). El mètode es basa en la capacitat dels peròxids d'oxidar els ions ferrosos (Fe II) a fèrrics (Fe III). La seva quantificació es realitza per la producció d'un color vermell al formar-se un complex entre el tiocianat d'amoni i el Fe III.

3.6.2 TBARS

És un mètode molt utilitzat per avaluar el grau d'oxidació dels lípids compostos per àcids grassos amb tres o més dobles enllaços (oxidació secundària). Es basa en l'aparició d'un compost rogenc degut a la presència d'un producte de condensació format per la unió d'una molècula de malondialdehid (MDA) (que es un dels derivats d'alguns dels productes de descomposició dels àcids grassos insaturats oxidats) amb dues molècules d'àcid tiobarbitúric (TBA).



Imatge 8. Reacció del TBA amb el MDA.

3.6.3 Espectroscòpia IR

L'energia IR produeix vibracions moleculars. Cada tipus d'enllaç químic vibra a una freqüència específica de manera natural. Per això quan la freqüència de la llum IR arriba a la freqüència de vibració de l'enllaç es produeix l'absorció. El conjunt d'absorbàncies IR per una mostra es coneix com el seu espectre IR. L'espectre IR d'una mostra és la quantitat d'energia IR (eix Y) que es absorbeix a determinades freqüències (eix X) en la regió IR de l'espectre electromagnètic.

Taula 6. Correlació número d'ona – tipus d'enllaç en IR

3500-3300	O-H, N-H	1740 (aprox.)	C=O d'èster
3300	C-H d'alquí	1730-1700	C=O d'aldehid, cetona ó àcid
3100-3020	C-H d'alquè o aromàtic	1675 (aprox.)	C=O d'amida
2980-2840	C-H d'alquil	1650 (aprox.)	C=C d'alquè
2750 (feble)	OC-H d'aldehid	1600 + 1500 (agudes)	C≡C d'aromàtic
2200 (aprox.)	C≡C ó C≡N		
1800-1770	C=O d'anhidrid o CO-Cl	1300 - 1000	Enllaç C-O

Segons la regió que analitza l'espectrofotòmetre existeixen tres regions d'aplicació de l'espectroscòpia infraroja:

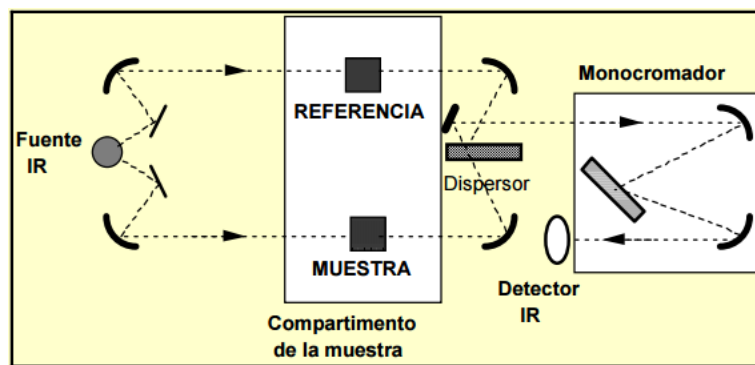
- ❖ **Infraroig mig (MIR):** és la regió més utilitzada. Va dels 200-4000 cm^{-1} . S'utilitza en anàlisis qualitius i quantitatius per espectres d'absorció, reflexió i emissió. Serà la utilitzada en l'experiment a realitzar.
- ❖ **Infraroig proper (NIR):** Va dels 4000-12800 cm^{-1} . Determinació quantitativa de rutina d'aigua, CO_2 , sofre, hidrocarburs baix pes molecular, compostos senzills d'interès.
- ❖ **Infraroig llunyà (FIR):** Va dels 200-10 cm^{-1} . Estructures d'espècies inorgàniques i organometàl·liques que utilitzen mesures d'absorció.

3.6.3.1 Equips d'espectroscòpia IR

**Imatge 9.** Diagrama de les parts d'un espectrofotòmetre de FTIR

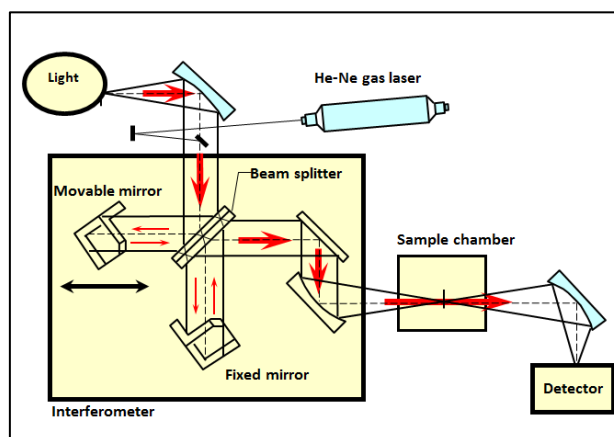
Segons l'aparell encarregat de filtrar la senyal:

- ❖ **Espectrofotòmetre amb dispersió:** Un monocromador separa la radiació IR en freqüències individuals. Una obertura de sortida aïlla la freqüència específica que arriba a la mostra.



Imatge 10. Diagrama d'un espectrofotòmetre amb dispersió [18]

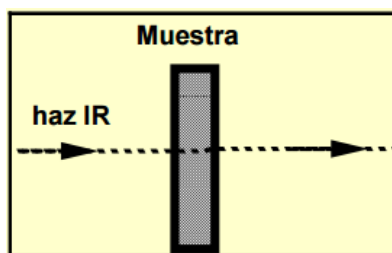
- ❖ **Espectrofotòmetre amb interferòmetre (FTIR):** En comptes de registrar els valors variant la freqüència de llum IR monocromàtica es guia la llum a un interferòmetre. La mesura es més ràpida degut a que la informació de totes les freqüències es fan al mateix temps. Així s'obtenen múltiples lectures i se'n fa un promig, aplicant l'operació matemàtica de Transformada de Fourier, augmentant d'aquesta manera la sensibilitat de l'anàlisi. Degut a aquestes avantatges els espectrofotòmetres moderns són per FTIR.



Imatge 11. Diagrama d'un espectrofotòmetre amb interferòmetre [18]

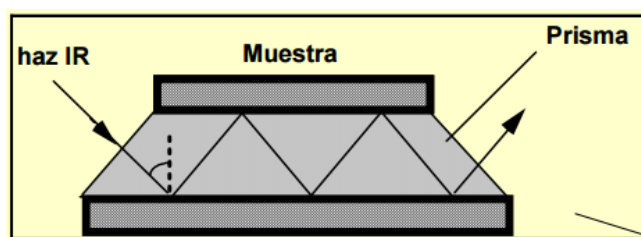
Segons la mostra analitzar existeixen les següents tècniques:

- ❖ **Mètode de transmissió:** Serveix per analitzar mostres transparents de films prims (<50µm) o de sòlids comprimits (es premsa una pastilla de KBr amb mostra 100:1).



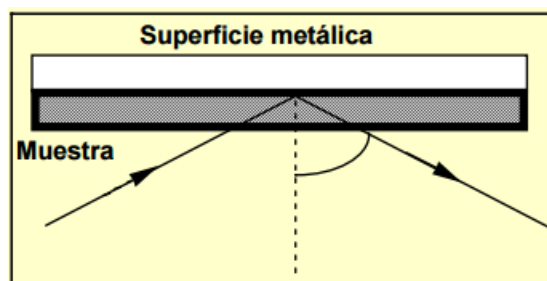
Imatge 12. Diagrama del mètode de transmissió [18]

- ❖ **ATR (attenuated total reflectance):** La radiació infraroja interactua amb la mostra a través d'ones evanescent. Es produeix una ona evanescent cada vegada que el raig IR es reflecteix per la cara interior del cristall. L'ona evanescent penetra la mostra a cada punt de reflexió. El complement ATR és un accessori útil per obtenir espectres IR de mostres que no poden ser col·locades en els suports habituals pel mètode de transmissió o bé que són opaques. L'accessori ATR necessita molt poca o cap preparació per la majoria de mostres i es una tècnica de mostreig molt versàtil. L'espectre resultant d'un ATR-IR s'assembla a un espectre IR convencional però té certes diferències: les posicions de bandes d'absorció són idèntiques en ambdós espectres però les intensitats relatives de les bandes corresponents són diferents sobretot en la zona de $1200-600\text{ cm}^{-1}$. És el mecanisme emprat en la lectura de l'estudi present.



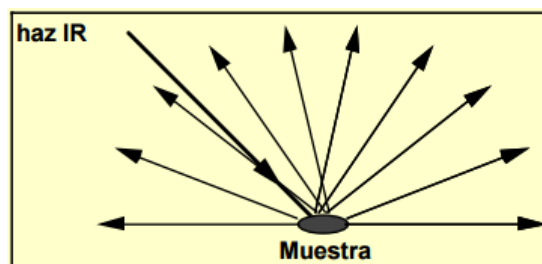
Imatge 13. Diagrama del mètode de ATR [18]

- ❖ **Reflexió especular:** La reflexió especular és un mètode per mesures superficials llises i s'utilitza en adhesius i recobriments metàl·lics.



Imatge 14. Diagrama del mètode de reflexió especular [18]

- ❖ **Reflexió difusa:** S'utilitza en mostres en pols (sense tractament previ) i es basa en una reflexió múltiple [18].



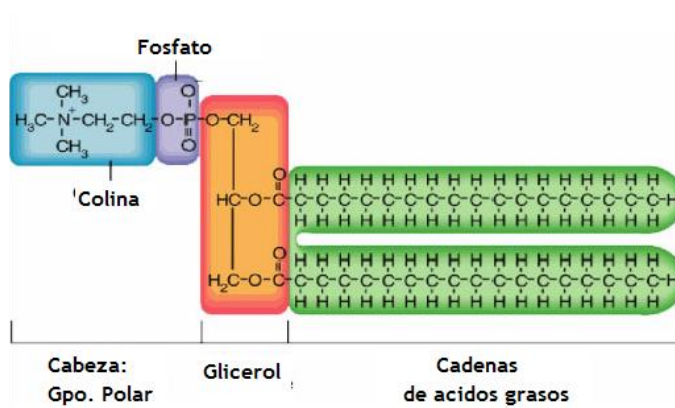
Imatge 15. Diagrama del mètode de la reflexió difusa [18]

3.6.3.2 Freqüències estudiades

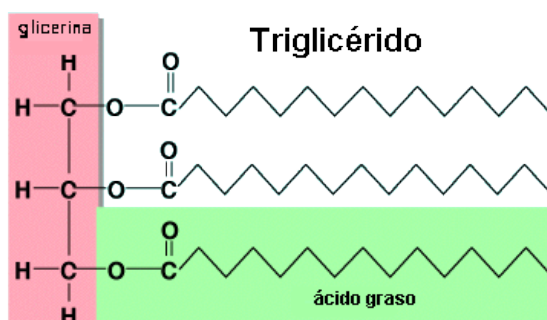
L'espectroscòpia vibracional, concretament la regió mitja del IR és una tècnica molt útil per caracteritzar el procés de deteriorament lipídic.

Els pics específics de l'oxidació dels lípids a estudiar són:

- **1742 cm^{-1}** : C=O èster. Durant el temps d'emmagatzematge el valor de l'absorbància disminueix ja que s'hidrolitza l'enllaç èster dels triglicèrids i dels fosfolípids.
- **1712 cm^{-1}** : C=O àcid carboxílic. Durant el temps d'emmagatzematge el valor de l'absorbància creix ja que s'estan formant àcids grassos lliures productes de la hidròlisi dels triglicèrids i dels fosfolípids [19].



Imatge 16. Estructura dels fosfolípids



Imatge 17. Estructura dels triglicèrids

4. Material i mètodes

4.1 Material i reactius

4.1.1 Aparells i material

Els aparells i els materials utilitzats van ser: Ultra-Turrax, balança, estufa, espectrofotòmetre, bany d'ultrasó, bany d'aigua, vòrtex, nevera, congelador, material general de vidre i plàstic de laboratori.

4.1.2 Reactius

Els reactius utilitzats van ser: TBA (Àcid tiobarbitúric), TCA (Àcid tricloroacètic), etanol, àcid clorhídric, clorur de ferro II tetrahidratat i tiocianat d'amoni. L'aigua destil·lada i l'aigua Milli-Q van ser extretes diàriament.

4.2 Planta

Les fulles van ser recol·lectades a Veneçuela la primavera del 2015 i a Mèxic la primavera de 2016. Es molen les fulles del Noni, i s'emmagatzemen (en un dessecador) en la foscor a temperatura ambient fins al seu ús.

4.3 Aliments

Es treballaran amb dos aliments diferents la carn de vedella i la sardina. La vedella es va adquirir en una empresa càrnica de Terrassa. La sardina es va adquirir durant l'abril-maig de 2016 del mercat de Les Corts, a Barcelona. El peix venia directament del port de Barcelona i l'experiment s'iniciava el mateix matí que s'adquiria el producte per minimitzar l'exposició de l'aliment a l'oxidació. La sardina va ser el peix escollit perquè és un peix blau que es pesca al Mediterrani i a més, és un aliment molt popular i consumit al país el qual es pot trobar a qualsevol mercat local [20].

4.4 Preparació d'extractes

Es pesen 0.25g de les fulles moltes i s'afegeixen 10ml d'etanol aigua al 50%. S'agiten en condicions de refrigeració, dins de la nevera, durant 24 hores. Es centrifuga l'extracte i es retira el sobrenedant. S'identifica l'extracte i es guarda al congelador a -20°C, fins a la seva utilització.

4.5 Fabricació dels films

4.5.1 Film de PLA

El film de PLA es prepara amb un 3% de PLA, 5% d'extracte i un 30% de cloroform. La mostra es va agitar 10min a 1500rev.

4.5.2 Film de gelatina-Noni

Es barreja la gelatina comercial amb l'aigua destil·lada escalfant-ho al bany maria. S'agita el contingut fins dissoldre completament la gelatina. Es treu del bany el vas i s'afegeix glicerol i un volum d'extracte de Noni.

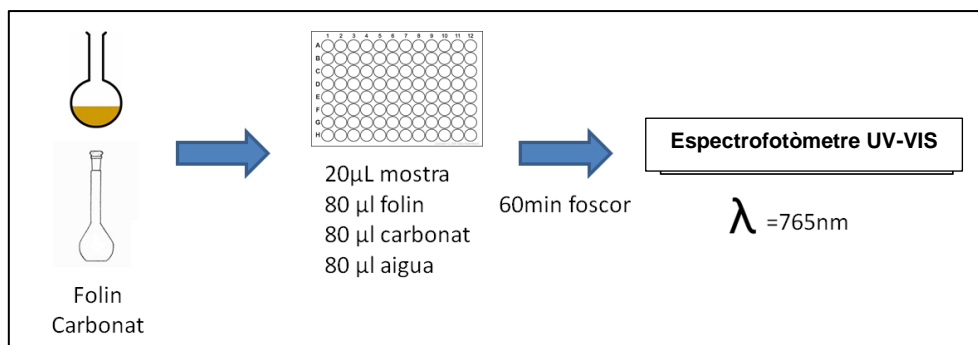
Un cop dissolt i agitat, estirem el film damunt una safata coberta amb plàstic de polietilè. Es deixa assecar 24h en estufa a 30°C.



Imatge 18. Film de gelatina-Noni

4.6 Mètode de Folin-Ciocalteu

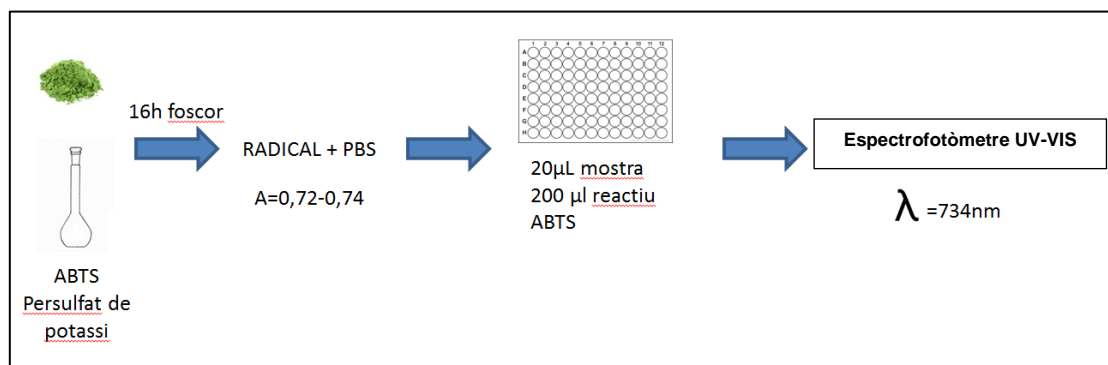
Es preparen dues dissolucions. La dissolució amb el reactiu Folin amb una concentració de 13% i una dissolució de carbonat al 36%. A la microplaca s'afegeixen 20 ul de mostra de l'extracte i es barregen amb 80 ul de Folin, 80ul de carbonat i 80ul d'aigua destil·lada. Es deixa a la foscor durant 60 min i es fa la lectura a 765 nm en front el blanc [13].



Imatge 19. Procediment experimental de l'assaig Folin-Ciocalteu

4.7 Mètode del ABTS

La solució del radical ABTS es produeix mitjançant la barreja d'una quantitat de ABTS (2'2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulonic acid) diammonium salt) per obtenir una concentració de persulfat de potassi 24,4mM i es deixa a temperatura ambient en absència de llum durant 16h. Amb aquesta dissolució radicalària de ABTS es prepara la dissolució de treball, ajustant amb PBS a una absorbància de 0.72-0.74 a 734 nm abans d'utilitzar-se. A la microplaca s'afegeixen 20 ul de mostra de l'extracte i es barregen en 200 ul del reactiu ABTS ajustat. El decreixement de l'absorbància a 734nm es mesura en front el blanc de PBS. L'ABTS s'expressa en uM d'equivalents de Trolox de capacitat antioxidant (TEAC) utilitzant l'equació obtinguda amb la corba de calibratge del Trolox amb ABTS [14].



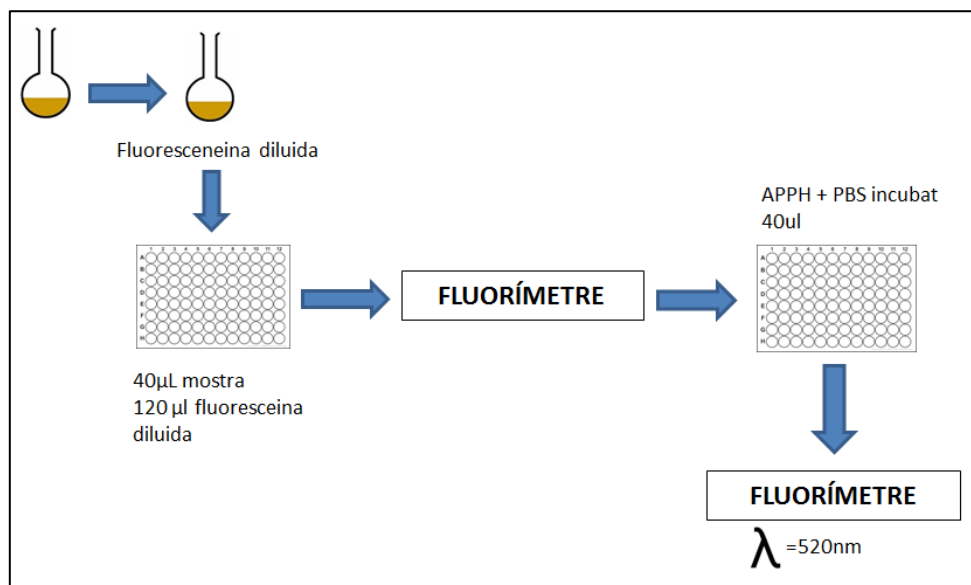
Imatge 20. Procediment experimental de l'assaig ABTS

4.8 Assaig ORAC

Els reactius utilitzats han estat el Trolox 97% (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-àcid carboxílic), PBS (Tampó fosfat salí), AAPH 97% (2,2-Azobis (2-metilpropinamida) dihidroclorur) 97% i la fluoresceïna ($\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$).

Per a la realització de l'assaig ORAC es preparen 5 patrons de Trolox de 40, 60, 80, 100 i 200 µL en PBS i una dissolució de fluoresceïna de 0,05032 ppm. S'afegeix 3:5 de fluoresceïna a cada un dels pous de la placa transparent i 1:10 de mostra, patró o blanc (segons correspongui). Es col·loca la placa a incubar a 37°C durant 10 minuts a l'interior de l'aparell i es realitza una primera lectura a l'instant 0. Es prepara una

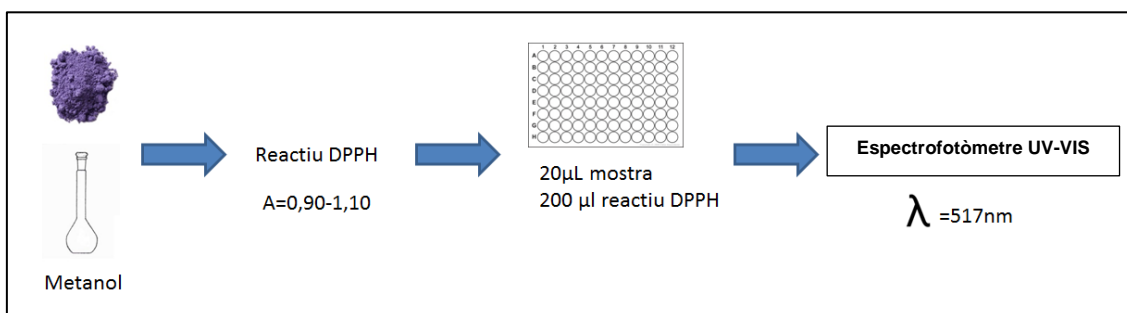
dissolució de AAPH en PBS de 54,24 g/L. S'afegeix la dissolució de AAPH a cada un dels pous i es realitzen lectures a intervals de 2 minuts durant 90 minuts per obtenir els valors de la cinètica [16].



Imatge 21. Procediment experimental de l'assaig ORAC

4.9 Assaig DPPH

El radical DPPH s'ajusta amb metanol a una absorbància de 0,9-1,0 ($\lambda=517$ nm) abans d'utilitzar-se. A la microplaca s'afegeixen en proporció 1:10 de mostra de l'extracte i es barregen en el reactiu ajustat amb un volum total de 220 microlitres. La barreja es llegeix a 517 nm amb el espectrofotòmetre UV-VIS [17].



Imatge 22. Procediment experimental de l'assaig DPPH

4.10 Eliminació d'antioxidants naturals de l'oli de gira-sol

L'oli de gira-sol comercial es purifica fent-lo passar per una columna que conté 300g d'alúmina prèviament activada en un forn a 200°C durant 24 hores. Aquest pas es necessari per eliminar els tocoferols, peròxids i traces de metalls que de forma natural són presents a l'oli de gira-sol. L'oli purificat s'emmagatzema a -20°C fins a la seva utilització.

4.11 Valor de peròxid

Prèviament s'han de preparar dos reactius:

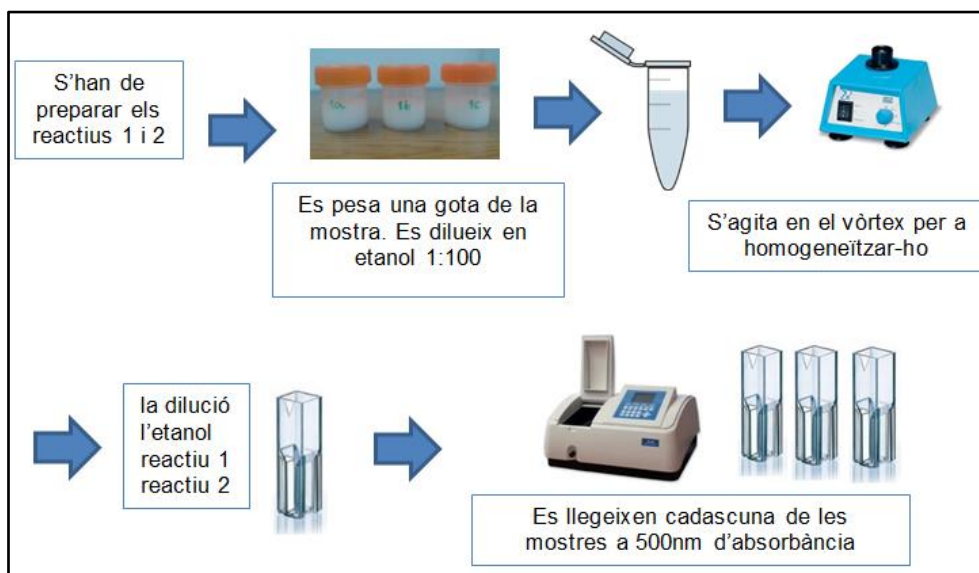
El primer consisteix en una dissolució de clorur de ferro II tetrahidratat en medi àcid.

El segon és una dissolució de tiocianat d'amoni dissolt en aigua MilliQ.

Un cop es tenen els reactius preparats, en un *ependorf* es pesa una gota de la mostra de l'emulsió. Es dilueix en etanol en una proporció de 1:100 i s'agita en el vòrtex per a homogeneïtzar-ho.

Es posen la dilució, l'etanol, reactiu 1 i reactiu 2 a les cubetes de plàstic. Amb les mateixes proporcions es prepara un blanc de referència que no contindrà mostra.

Es llegeixen cadascuna de les mostres a 500 nm d'absorbància. Prèviament s'han d'agitar per homogeneïtzar. S'ha de tenir en compte el rang de treball de l'aparell, l'absorbància del qual ha de ser entre 0,1 i 1'2, si sobrepassa aquest valor la mostra s'ha de diluir.



Imatge 23. Esquema del procediment experimental per la prova del valor peròxid

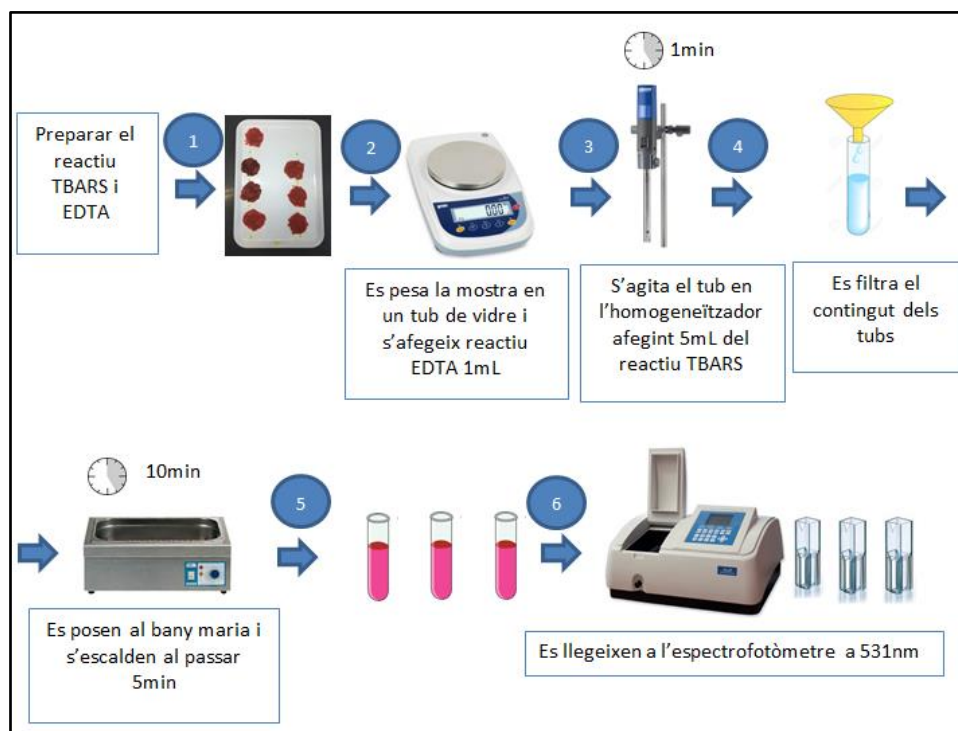
4.12 Condicionament de les meat-burg

Abans de fer la prova del TBARS la carn de vedella es macerada amb 1,5% de sal comuna que en grams equival a 11,25g de sal. La quantitat de carn utilitzada és 1kg. Per tant, la carn de vedella es pica doblement i s'amassa amb sal a $T < 5^{\circ}\text{C}$ per aconseguir homogeneïtat. Després s'embolica amb paper film i es deixa en refrigeració fins al seu ús.

4.13 TBARS per a les meat-burg i fish-burg

El reactiu TBARS es va preparar amb 15% de TCA, 0,375% de TBA i 2,1% HCl.

Es pesa 1 g de la mostra i s'afegeix 1 ml d'EDTA. S'agita amb 5 mL del reactiu TBARS en l'homogeneïtzador Ultra-Turrax durant 1min a 32000rpm. Es filtra per obtenir la part soluble del solvent. Totes les mostres es conserven en gel durant el procediment. Immediatament les mostres filtrades són submergides en un bany d'aigua precalentat a 95°C durant 10 minuts. Les mostres són refredades a temperatura ambient durant 10 minuts i l'absorbència es mesura a $\lambda = 531 \text{ nm}$. El valor de TBARS es calcula amb la corba de calibrat del MDA. Els resultats s'expressen com mg de MDA/kg de carn.



Imatge 24. Esquema del procediment experimental per la prova del TBARS

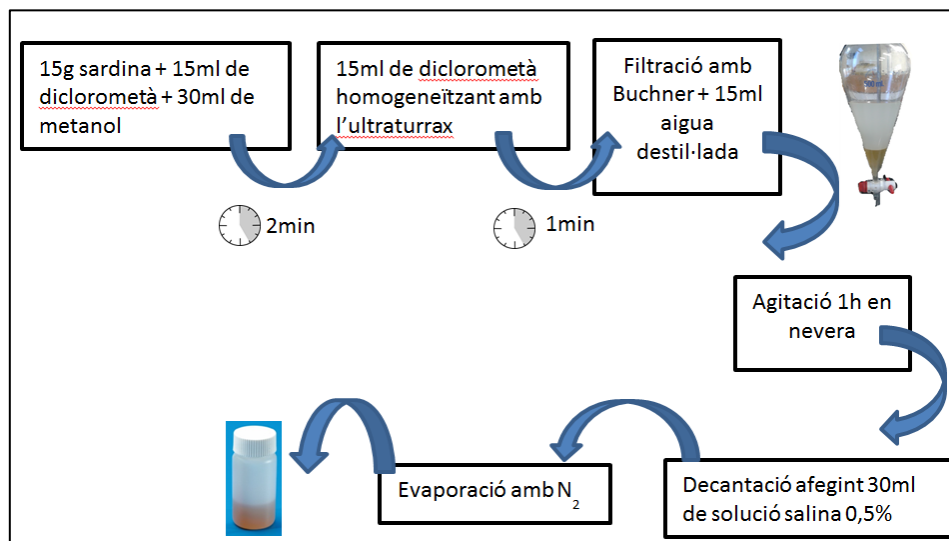
4.14 Espectroscòpia IR

4.14.1 Extracció del greix de les sardines

L'extracció dels lípids de la sardina s'ha fet seguint el mètode de Bligh and Dyer (1959) com segueix en l'article [19]. La mostra (15 g de sardina picada) s'homogeneïtza amb 45 ml d'una barreja metanol: diclorometà (2:1) durant 2 minuts utilitzant un homogeneïtzador (Ultra-Turrax). L'homogeneïtzat se li afegeixen 15 ml de diclorometà homogeneïtzant durant 1 minut.

Després es filtra amb un Buchner i se li afegeixen 15 ml d'aigua al filtrat. S'aboca en un matràs erlenmeyer i es deixa en agitació en nevera durant una hora. Després es decanta en un embut de decantació i es recull la fase inferior (la que conté els lípids).

En un evaporador amb nitrogen s'evapora el dissolvent i es recull els lípids sòlids en un vial per a la posterior lectura en l'espectrofotòmetre d'infraroig [19].

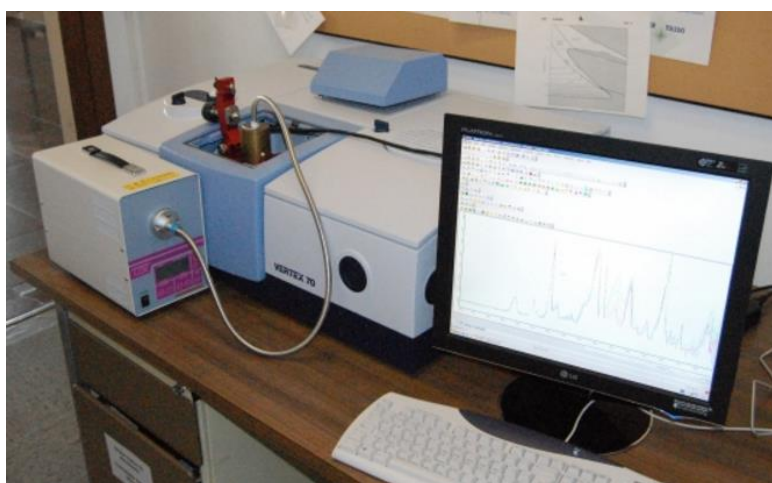


Imatge 25. Esquema del procediment experimental de l'extracció de lípids de la sardina

4.14.2 Espectrofotòmetre d'infraroig FTIR amb ATR

L'equip (VERTEX model 70) permet identificar grups funcionals de materials orgànics i determinades estructures de mostres sòlides i líquides, mitjançant espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (FTIR), en el rang espectral de 400 a 10 000 cm^{-1} . L'equipament està preparat per recollir 60 espectres per segon a una resolució de 16 cm^{-1} i pot treballar en mode de transmissió o de reflectància total atenuada (ATR) amb control tèrmic entre 25 i 200 °C.

Per avaluar el grau d'oxidació dels greixos de la sardina s'han utilitzat com a bandes de referència les ubicades a 2900 cm^{-1} degut a que no presenten canvis significatius al llarg de l'oxidació en el temps.



Imatge 26. Espectrofotòmetre d'infraroig FTIR amb ATR

5.2 Estudi previ de l'extracte

5.2.1 Prova del TPC

El contingut de polifenols totals (TPC) de cada mostra expressats en equivalents d'àcid gàl·lic per gram de mostra seca es mostren a la taula següent.

Taula 7. Valors del TPC expressats com la mitjana \pm desviació estàndard d'anàlisis triplicats

Mostra	Milimols equivalents d'àcid gàl·lic/g mostra seca
Fulla Veneçuela	34,591 \pm 0,069 ^a
Fulla Mèxic	43,692 \pm 0,148 ^a
Fulla Mèxic fermentada	6,289 \pm 0,006 ^b
Noni [22]	92,39 \pm 111,81 (fulla)
Te Verd [21]	245-837

Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents.

5.2.2 Prova del ORAC

L'activitat antiradicalaria amb el radical APPH expressada en milimols equivalents de Trolox per gram de mostra (pes sec) es mostren a la taula següent.

Taula 8. Valors de l'ORAC expressats com la mitjana i la desviació estàndard d'anàlisis triplicats

Mostra	Milimols equivalents de Trolox/g mostra seca
Fulla Veneçuela	27,822 \pm 1,538 ^a
Fulla Mèxic	24,779 \pm 0,143 ^a
Fulla Fermentada	3,702 \pm 0,878 ^b
Noni [16]	6,8-9,4 (polpa)
Te Verd [21]	2,4-29

Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents.

5.2.3 Prova del ABTS

L'activitat antiradicalaria amb el radical catiónic ABTS expressada en milimols equivalents de Trolox per gram de mostra seca es mostren a la taula següent.

Taula 9. Valors de l'ABTS expressats com la mitjana i la desviació estàndard d'anàlisis triplicats

Mostra	Milimols equivalents de Trolox/g mostra seca
Fulla Veneçuela	1,244 ± 0,032 ^a
Fulla Mèxic	1,423 ± 0,012 ^b
Fulla Fermentada	0,161 ± 0,002 ^c
Noni [13][17]	0,22-1,67 (polpa)
Te Verd [21]	1,87-15,3

Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents. Totes tres mostres són significativament diferents.

5.2.4 Prova del DPPH

L'activitat antiradicalaria amb el radical DPPH es mostra al gràfic següent.

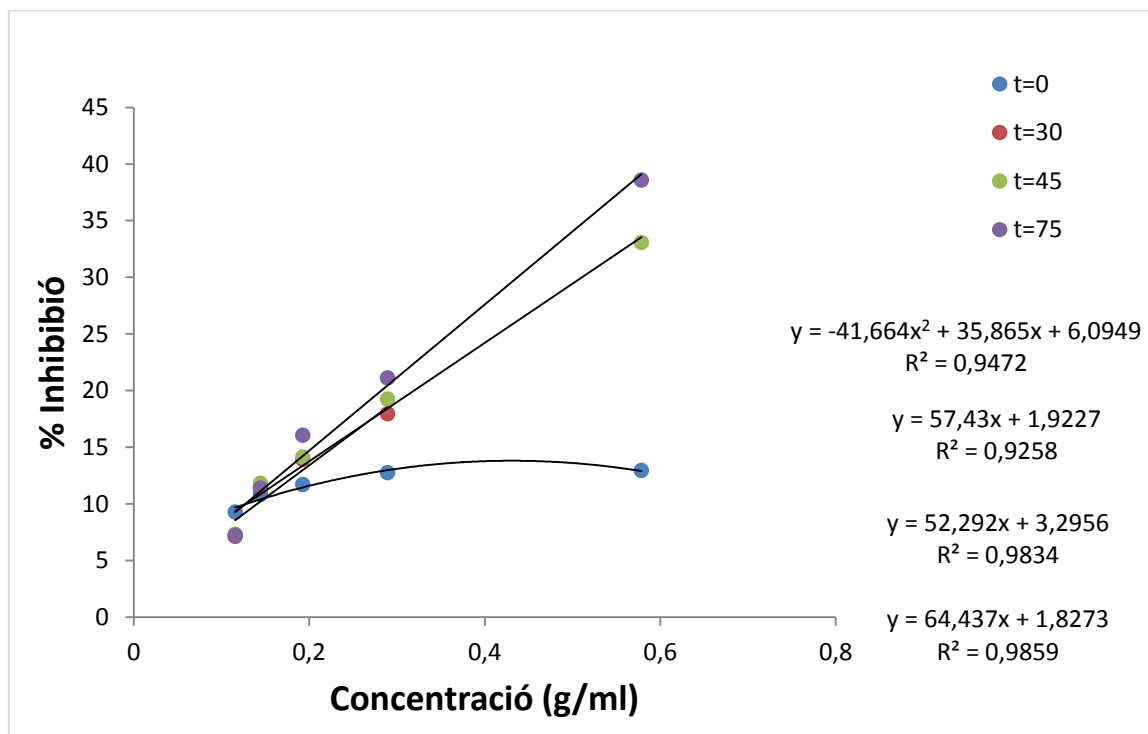


Figura 2. Gràfic de l'activitat antiradicalaria amb el radical DPPH.

A temps 0 quasi no hi ha variació entre concentracions ja que la reacció entre el radical DPPH i la mostra s'està iniciant. A partir dels 30 minuts s'observa una

tendència lineal i proporcional entre les concentracions i el valor d'inhibició del radical DPPH.

Expressem el IC_{50} que es el valor de concentració de la mostra necessària per inhibir un 50% el radical DPPH. Aquest valor es calcula a partir de la recta de regressió donant un valor de concentració de 0,748 g/ml d'extracte.

La mostra de fulla de Mèxic com la fermentada no s'han representat gràficament ja que els resultats obtinguts no són coherents (valors negatius). Aquest fet es pot deure a l'existència de reaccions paral·leles entre algun dels components de la mostra estudiada i el reactiu DPPH.

5.2.5 Correlació entre els diferents mètodes d'activitat antiradicalària

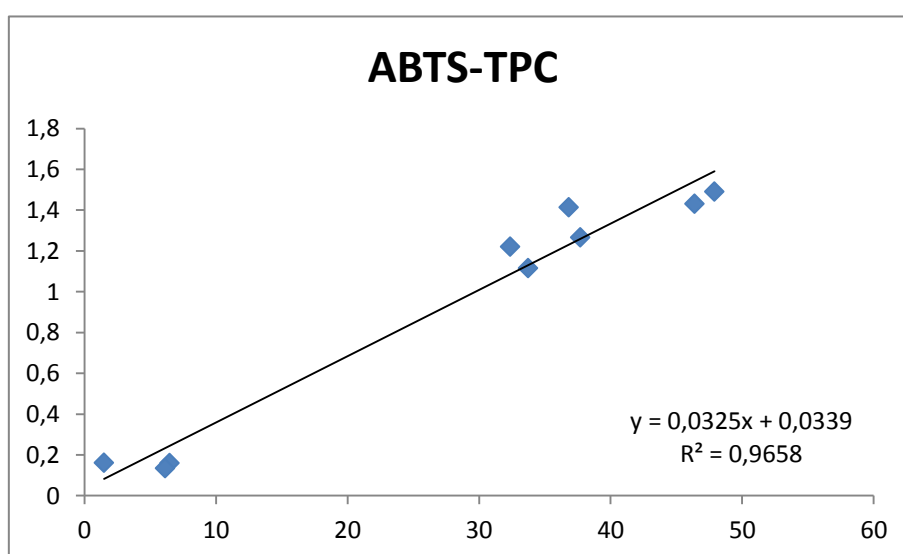


Figura 3. Correlació lineal entre els mètodes ABTS i TPC

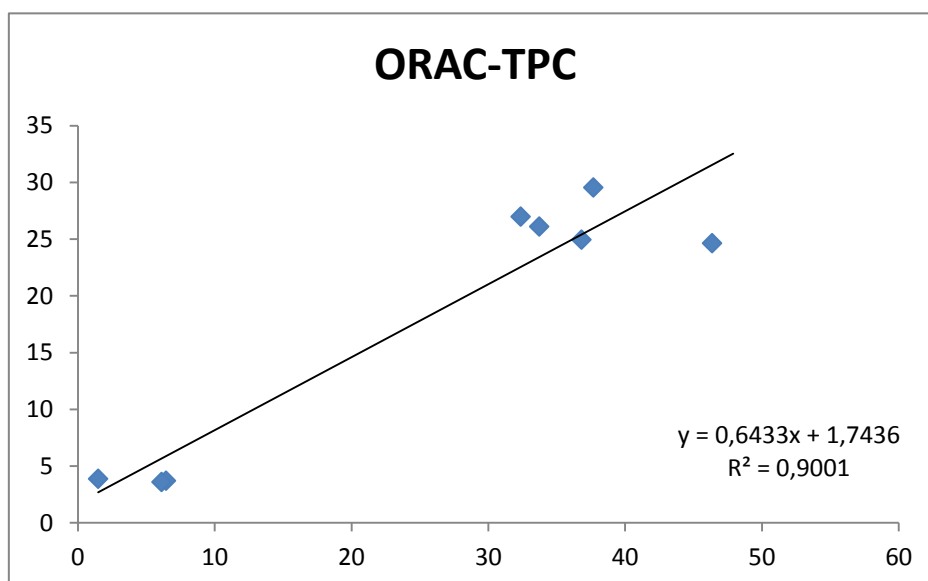


Figura 4. Correlació lineal entre els mètodes ORAC i TPC

Tant els valors de la fulla de Veneçuela com els de la fulla de Mèxic estan dins del rang admissible i per tant sí tenen poder antioxidant. Els valors de la fulla de Mèxic d'aspecte fermentat són coherents amb el que s'esperava ja que són les que tenen un TPC més baix. Aquest fet es pot deure a la pèrdua de polifenols durant la fermentació [7].

En les figures 2 i 3 s'han representat la correlació existent entre els mètodes antiradicalaris i el TPC i s'aprecia una forta correlació positiva entre mètodes (valor de coeficient de correlació R^2 superior a 0,9). Aquests resultats són similars a alguns trobats a la bibliografia [7].

Els valors obtinguts a cada mètode es poden veure afectats per factors externs com ara l'estat del terra on creix la planta estudiada, l'època de l'any en que s'ha recol·lectat, el mètode d'extracció utilitzat així com la part de la planta que s'estudia [4]. Tots aquests factors alteren el valor final de les mesures tot i així els resultats obtinguts demostren que les fulles del noni estudiades sí tenen capacitat antioxidant.

5.3 Experiments

Es realitzen diversos experiments per veure la capacitat antioxidant del noni a partir de la mesura de l'oxidació de les mostres.

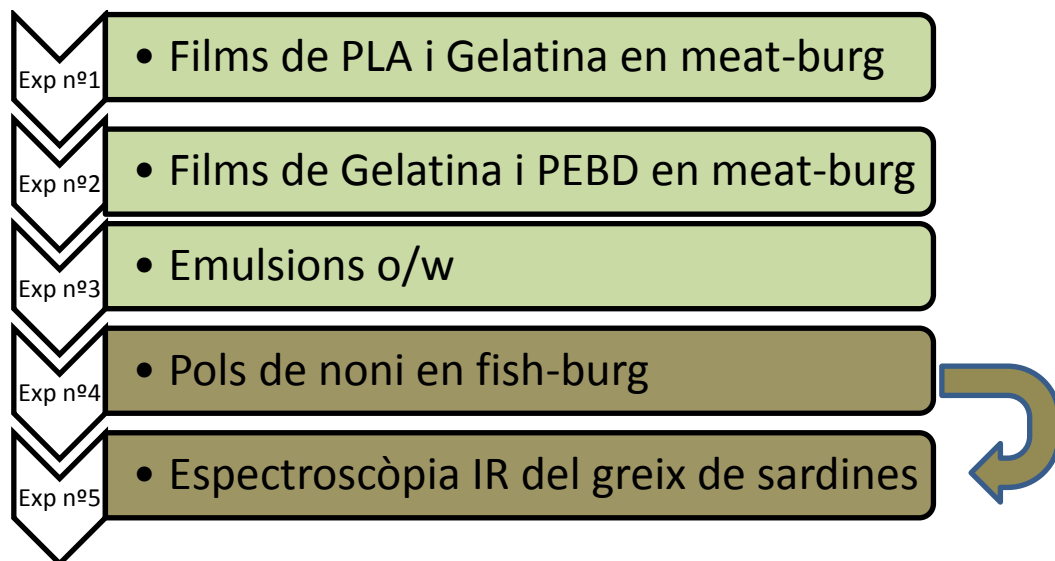


Figura 5. Diagrama de l'evolució del projecte

5.3.1 EXPERIMENT nº1, previ: Films de PLA i Gelatina en meat-burg

5.3.1.1 Resultats

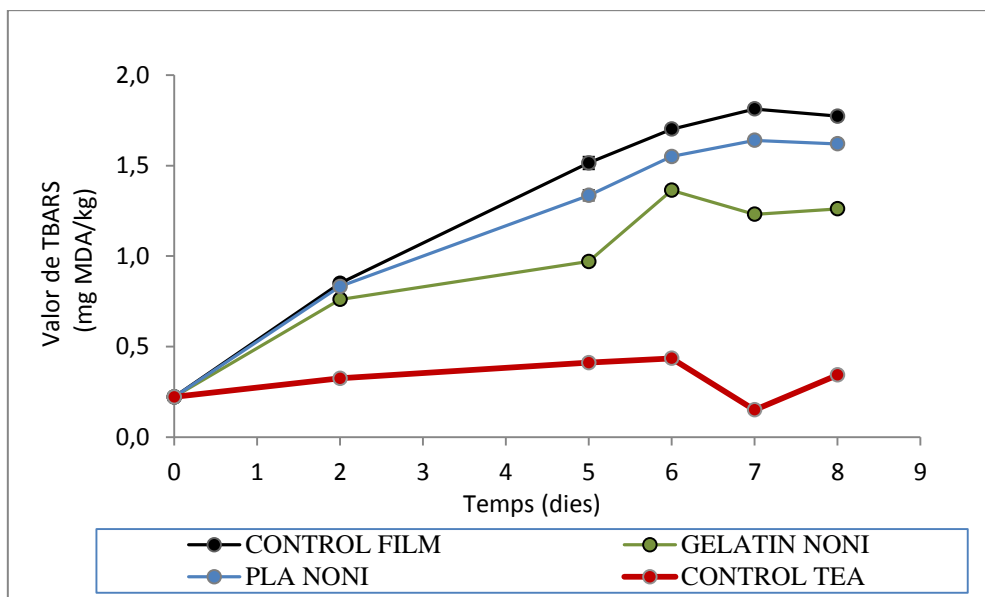


Figura 6. Gràfic de l'evolució del valor TBARS dels films al llarg del temps

En aquest cas s'analitzarà la oxidació secundària mesurant el TBARS. S'analitzarà film de PLA amb extracte de noni, film de gelatina amb extracte de noni, com a control positiu s'utilitzaran els films de PEBD (polietilè de baixa densitat) tractat amb te verd i com control negatiu sol amb carn de vedella i un film no activat per veure la protecció front la oxidació en el temps de cadascun. La carn utilitzada és carn de vedella.

La gràfica 6 recull l'evolució de l'oxidació secundària de les mostres durant un temps de 8 dies. En aquest experiment la mostra *Control film* és la que s'oxida més ràpidament per tant es la que menys protegeix la mostra front l'oxidació. Segueix un comportament similar al *PLA noni*.

La mostra de *Gelatin Noni* 0,375% s'oxida però més lentament que la resta de films. Per tant presenta més protecció enfront de l'oxidació que la resta de films.

La de *Control Tea* no presenta oxidació al llarg del temps. Compleix la funció de control positiu per poder comparar les mostres amb l'antioxidant natural.

Els resultats estan dins del que cabia esperar: l'ordre de protecció front l'oxidació de les diferents mostres en ordenació de protecció creixent són: *Control film* < *PLA noni* < *Gelatin Noni* < *Control Tea*.

5.3.1.2 Millores

Els resultats mostren que el film de noni més adient per protegir enfront l'oxidació és el de gelatina tot i que no està funcionant amb la capacitat antioxidant que s'espera.

Per tant s'haurà de plantejar l'opció de refer el film duplicant la concentració de extracte o reduint a la meitat el volum del dissolvent etanol-aigua 50%. A més es posarà film per les dues cares de la mostra de carn.

5.3.2 EXPERIMENT nº2: Films de Gelatina i PEBD en meat-burg

5.3.2.1 Condicions de l'experiment

En el segon experiment es decideix fer sols el film de gelatina amb Noni. En aquest cas s'analitzarà la oxidació secundària mesurant el TBARS. Com control positiu s'utilitzaran els films de PEBD (polietilè de baixa densitat) tractat amb te verd (en dos concentracions diferents) els quals són films activats adquirits en una empresa externa i com control negatiu sol amb carn per veure la protecció front la oxidació en el temps de cadascun. No s'ha fet un control solament amb film de gelatina (sense afegir extracte) ja que anteriorment s'ha fet i es va veure que el comportament és molt similar al control sol amb carn.

5.3.2.2 Resultats

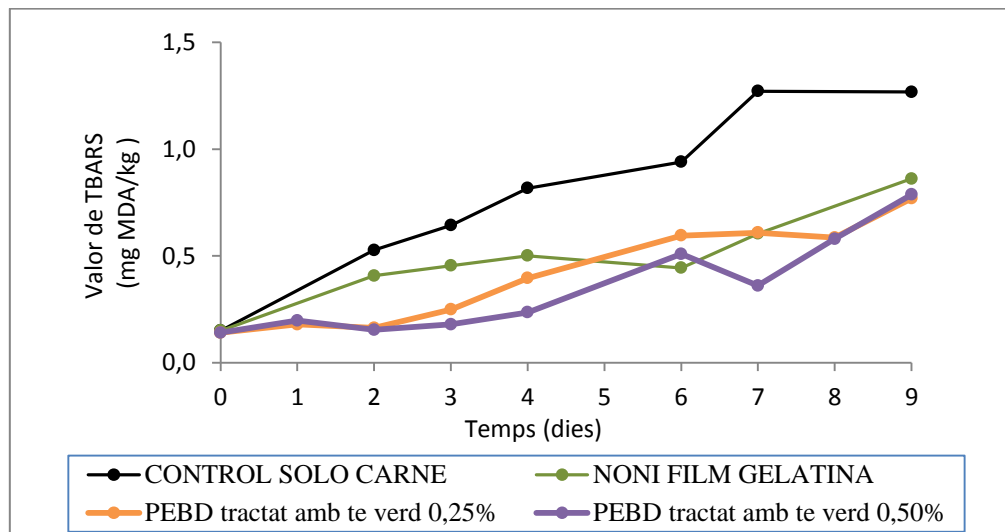


Figura 7. Gràfic de l'evolució del valor TBARS del film NONI al llarg del temps.

La gràfica 7 recull l'evolució de l'oxidació secundària de les mostres durant un temps de 9 dies. En aquest experiment la mostra *control sols carn* és la que s'oxida més ràpidament per tant és la que menys protegeix la mostra enfront l'oxidació. La mostra de *noni film gelatina* s'oxida però més lentament que la *control*. Per tant presenta més protecció enfront de l'oxidació que la mostra sense film. La de *0,25% PEBD* presenta menys oxidació al llarg del temps que la *noni film gelatina* i la mostra *0,5% PEBD* encara hi protegeix més. Tal i com era d'esperar el grau d'oxidació és menor quan més alta és la concentració d'antioxidant. L'ordre de protecció enfront l'oxidació de les diferents mostres en ordre de protecció creixent són: *control* < *gelatin noni* < *PEBD 0,25%* < *PEBD 0,5%*.

Taula 10. Valors de TBARS (mg MDA/kg) del dia 4 d'experiment

Control	0,81690 ± 0,01229 ^a
Film de gelatina-Noni	0,5009 ± 0,0245 ^b
PEBD tractat amb te verd 0,25%	0,2548 ± 0,0157 ^c
PEBD tractat amb te verd 0,5%	0,19091 ± 0,00235 ^c

S'ha realitzat un anàlisi estadístic dels valors de TBARS en un dia intermig de l'experiment. Les dades són la mitjana ± desviació estàndard dels valors de TBARS del dia 4 d'experiment. Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents ($\alpha < 0,05$). Tots els valors són estadísticament diferents entre ells tret dels dos films de PEBD els quals no presenten diferències significatives.

5.3.2.3 Canvis en el color

Els valors de color obtinguts amb el programa CIELab es mostren a la taula . El valor de a^* (redness o vermellor) és el paràmetre de color més important quan s'avalua l'oxidació de la carn ja que el decreixement de la vermellor fa de la carn un producte no acceptable per als consumidors. En totes les mostres la vermellor (valor de a^*) decreix a mesura que l'emmagatzematge en el temps progressa. Al final de l'experiment (dia 9), la intensitat del paràmetre vermellor es inferior al mesurat al dia 0 d'experiment com a resultat del procés oxidatiu donant així un canvi en el color. És fa notar que els efectes protectors dels extractes en la pèrdua del color no són tant pronunciats com l'efecte protector en front de la oxidació lipídica (prova del TBARS).

Taula 11. Valors de vermellor (a^*) de les mostres analitzades durant l'experiment

CARACTERÍTICA	DIA	CONTROL	FILM GELATINA-NONI	FILM PEBD 0,25%	FILM PEBD 0,5%
Redness (a^*)	0	57,42	57,00	57,00	57,00
	2	49,17	43,83	50,00	43,27
	3	50,00	42,16	43,32	37,47
	4	50,66	41,70	45,96	38,24
	6	26,84	35,00	32,89	34,41
	7	16,91	30,18	22,00	25,70
	9	10,00	22,05	19,68	22,97

5.3.3 EXPERIMENT nº3: Emulsions o/w

Les emulsions són un *food-model* molt acceptat per avaluar la capacitat antioxidant dels residus vegetals. Les emulsions utilitzades seran oli-aigua-tween20 amb la mostra. En aquest experiment es reflexa l'oxidació primària amb el mètode del valor peròxid. La protecció a l'oxidació és proporcional a la concentració d'antioxidants afegits, però una concentració massa elevada pot tenir l'efecte contrari, ser prooxidant.

5.3.3.1 Resultats VP

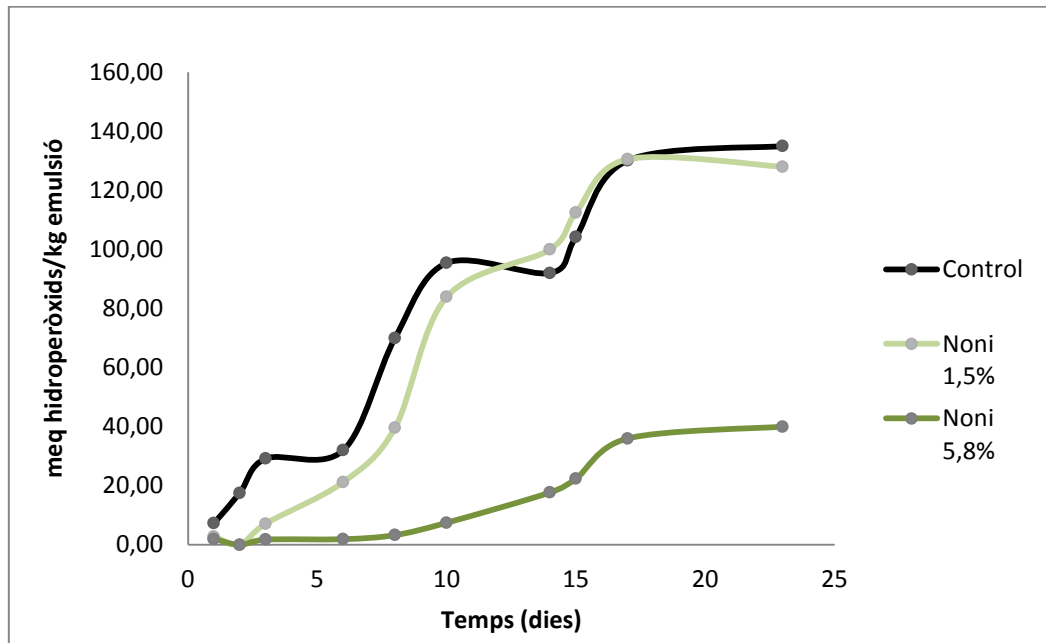


Figura 8. Gràfic de l'evolució del VP de les emulsions de noni al llarg del temps

La gràfica 8 recull l'evolució de l'oxidació primària de les mostres durant un temps de 22 dies. En aquest experiment la mostra *Control* és la que s'oxida més ràpidament, al sisè dia d'experiment ja pateix una forta oxidació que s'aprecia al gràfic amb una pujada brusca i continua al llarg del temps del seu valor de VP.

La mostra de *Noni 1,5%* presenta més resistència a l'oxidació al llarg del temps que la mostra control als inicis de l'experiment. Però aquesta a partir del dia 8 comença a pujar de valor VP i a oxidar-se.

La de *Noni 5,8%* no presenta oxidació al llarg del temps i per tant és l'emulsió més vàlida en quan a termes de protegir en front l'oxidació. Comença a oxidar-se a partir del dia 17 d'experiment.

L'ordre de protecció enfront l'oxidació de les diferents mostres en ordre de protecció creixent són: *Control* < *Noni 1,5%* < *Noni 5,8%*.

5.3.3.2 Evolució del pH

En la taula següent es mostren els valors de pH de les emulsions durant l'emmagatzematge de 23 dies. Els valors de pH de totes les mostres decreix amb el pas del temps. Aquest canvi de pH es pot deure a l'aciditat que produeixen la formació d'hidroperòxids al llarg del temps.

Taula 12. Canvi en el pH durant l'experiment

CARACTERÍSTICA	DIA	CONTROL	NONI 1,5%	NONI 5,8%
pH	2	3,52 ± 0,03	3,48 ± 0,05	3,81 ± 0,08
	7	3,19 ± 0,07	3,40 ± 0,01	3,67 ± 0,03
	9	3,89 ± 0,08	3,65 ± 0,04	3,70 ± 0,04
	14	2,85 ± 0,15	3,17 ± 0,07	3,66 ± 0,07
	16	2,76 ± 0,11	3,05 ± 0,04	3,41 ± 0,16

5.3.3.3 Anàlisi estadístic

Per poder realitzar l'anàlisi estadístic s'han agafat les dades de valor peròxid de cadascuna de les mostres a analitzar utilitzant el temps que triga en arribar a un valor determinat. S'ha calculat el temps que triguen en arribar a un valor d'hidroperòxids igual a 10meq/kg d'emulsió (valor màxim permès en olis segons la legislació) a 20meq/kg i a 30meq/kg.

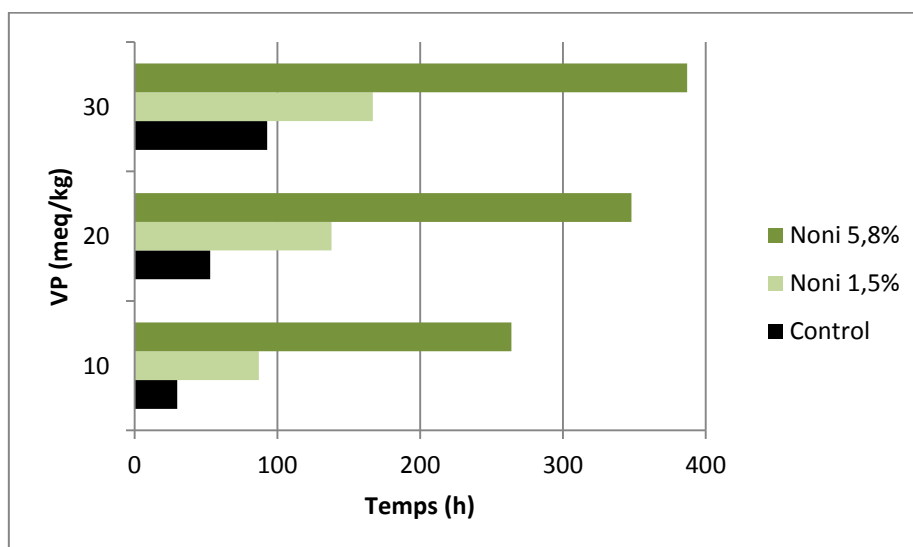


Figura 9. Temps de les mostres en arribar a diferents valors de peròxid.

La figura 9 recull els temps que triguen cada una de les mostres en arribar a certs valors VP. És una representació més clara del que s'ha extret del gràfic anterior on s'aprecia que l'emulsió de noni 1,5% endarrereix l'oxidació de l'emulsió dues vegades més que si no duu extracte i per la de noni 5,8% es fins a tres vegades més lent en el temps que el control.

Amb el programa Minitab es realitza una ANOVA (anàlisi de variància) d'un factor. Les dades obtingudes es resumeixen a la taula 10.

Taula 13. Temps mig de les mostres.

	VP10	VP20	VP30
Control	30,350 ± 0,965 ^c	55,66 ± 9,66 ^c	74,1 ± 19,8 ^b
Noni 1,5%	89,94 ± 9,99 ^b	141,0 ± 18,5 ^b	169,09 ± 14,47 ^b
Noni 5,8%	285,5 ± 34,9 ^a	366,4 ± 34,1 ^a	410,8 ± 61,7 ^a

Les dades són la mitjana ± desviació estàndard del temps. Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents ($\alpha < 0,05$).

5.3.4 EXPERIMENT nº4: Pols de noni en fish-burg

5.3.4.1 Condicions de l'experiment

Es tracten 500 g de sardina fresca del mercat local. El peix es neteja i es pela obtenint dos filets per sardina. Després s'embolica amb paper film i es deixa en a -18 °C. Es pica tota la massa de sardina per homogeneïtzar la mostra i es fan les fish-burg. Es fan 3 parts:

- Sense res (control)
- Amb 5% de té verd (control positiu)
- Amb 5% de noni

5.3.4.2 Resultats

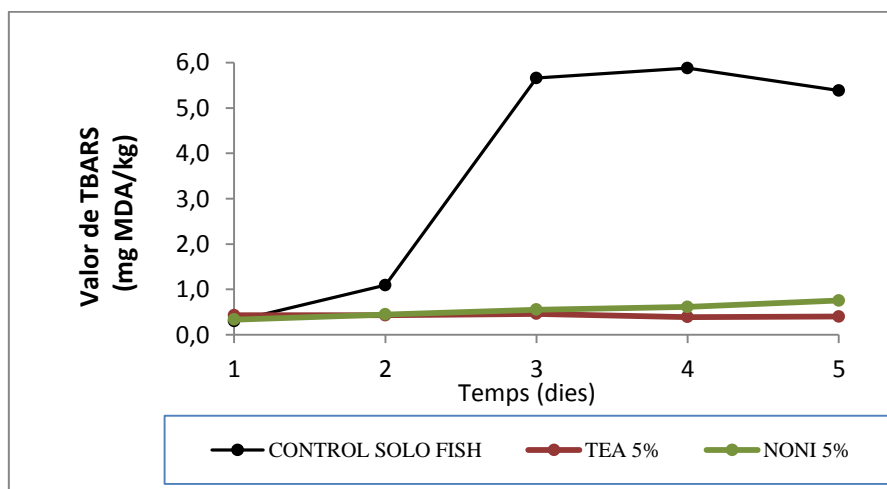


Figura 10. Gràfic de l'evolució del valor de TBARS de les fish-BURG al llarg del temps

La gràfica 10 recull l'evolució de l'oxidació secundària de les mostres durant un temps de 4 dies. En aquest experiment la mostra *control solo fish* és la que s'oxida més ràpidament, al segon dia d'experiment ja pateix una forta oxidació que s'aprecia al gràfic amb una pujada brusca i continua al llarg del temps del seu valor de TBARS. La mostra de *noni 5%* no presenta quasi oxidació al llarg del temps. Per tant presenta una protecció enfront de l'oxidació de la mostra. Cal fer notar que la coloració intrínseca del Noni feia que els valors d'absorbància de partida fossin majors però aquests han estat corregits ja que el valor de dita absorbància es degut al color i no a l'oxidació de la mostra. La de *tea 5%* no presenta oxidació al llarg del temps i per tant compleix amb la funció de control positiu de l'experiment. Presenta menys oxidació al llarg del temps que la *noni 5%* encara que la diferència és poc significativa.

L'ordre de protecció enfront l'oxidació de les diferents mostres en ordre de protecció creixent són: *control* < *noni 5%* < *tea 5%*.

Taula 14. Valors de TBARS del dia 5 d'experiment.

Control	4,644 ± 1,544 ^a
Noni 5%	0,7517 ± 0,0911 ^b
Te verd 5%	0,4002 ± 0,0371 ^b

S'ha realitzat un anàlisi estadístic dels valors de TBARS en un dia intermig de l'experiment. Les dades són la mitjana ± desviació estàndard dels valors de TBARS del dia 5 d'experiment. Els valors amb la mateixa lletra al superíndex no són significativament diferents ($\alpha < 0,05$). Control presenta diferències significatives amb les mostres que contenen noni i te verd en un 5%. Les mostres de noni i te verd no presenten diferències significatives entre elles.

5.3.5 EXPERIMENT nº5: Espectroscòpia IR del greix de sardines

5.3.5.1 Resultats

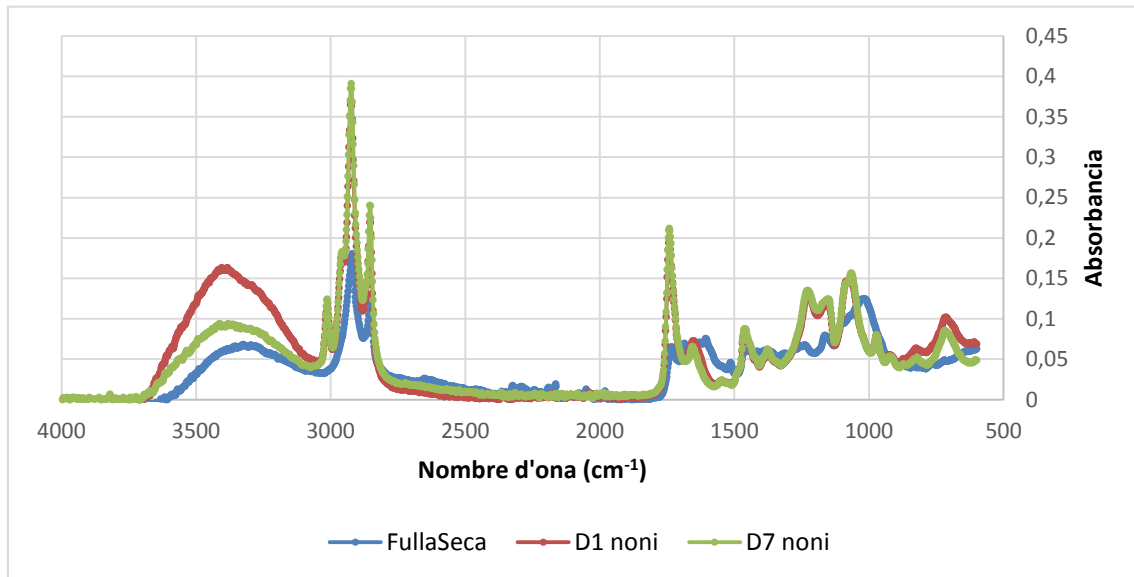


Figura 11. Espectre infraroig de les mostres de sardina amb noni i del noni pur al llarg del temps

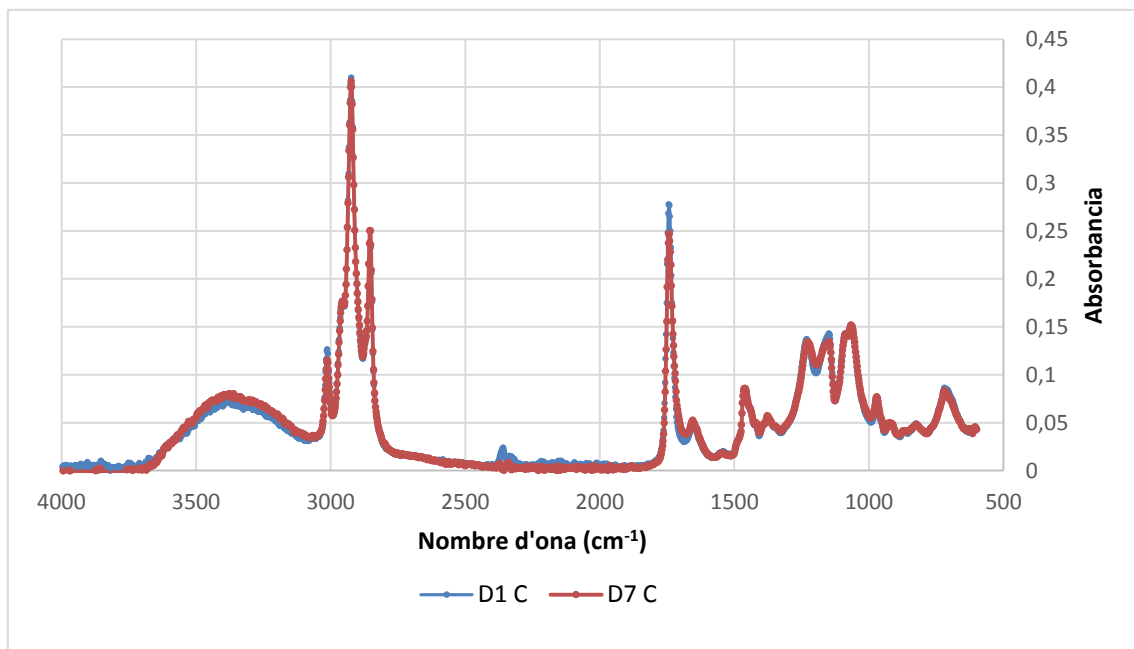


Figura 12. Espectre infraroig de les mostres de sardina sense noni al llarg del temps

Les figures 11 i 12 mostren l'espectre FTIR-ATR (regió 3500-650 cm^{-1}) dels lípids extrets dels filets de sardina. S'ha fet l'assignació de les bandes amb el respectiu grup funcional [19].

Taula 15. Correlació nombres d'ona amb grup funcional

LONGITUD D'ONA (cm ⁻¹)	GRUP FUNCIONAL
3000-2800	C-H: grups metil terminals de l'àcid gras
2923,2853	C-H: banda forta, simètric i asimètric del metilè
2955	CH ₃ asimètric
3013	=C-H: cis grups olefínics
1742	C=O: banda forta d'èster
1712	C=O: grup àcid carboxílic
1656	C=C: banda dèbil dels grups acil insaturats
1465	CH ₂ i CH ₃ de grups alifàtics
1419	C-H de les olefines
1377	CH ₃ simètric
1229	PO ⁻² dels fosfolípids
1160, 1062	C-O asimètric i simètric de l'èster
1086	PO ⁻² dels fosfolípids

L'espectre FTIR dels lípids extrets revela importants canvis en la regió carbonil (1800-1600 cm⁻¹) durant el període d'emmagatzematge. Els principals pics a analitzar són les diferents intensitats d'absorbància de les bandes 1742 i 1712 cm⁻¹. La banda de 1742 cm⁻¹ corresponent a l'enllaç èster C=O que disminueix durant l'emmagatzematge al llarg d'una setmana. Quan té lloc la lipòlisi es genera una banda a 1712 cm⁻¹ corresponent als grups carboxílics C=O dels àcids grassos. Aquesta va creixent a mesura que avança l'emmagatzematge en el temps.

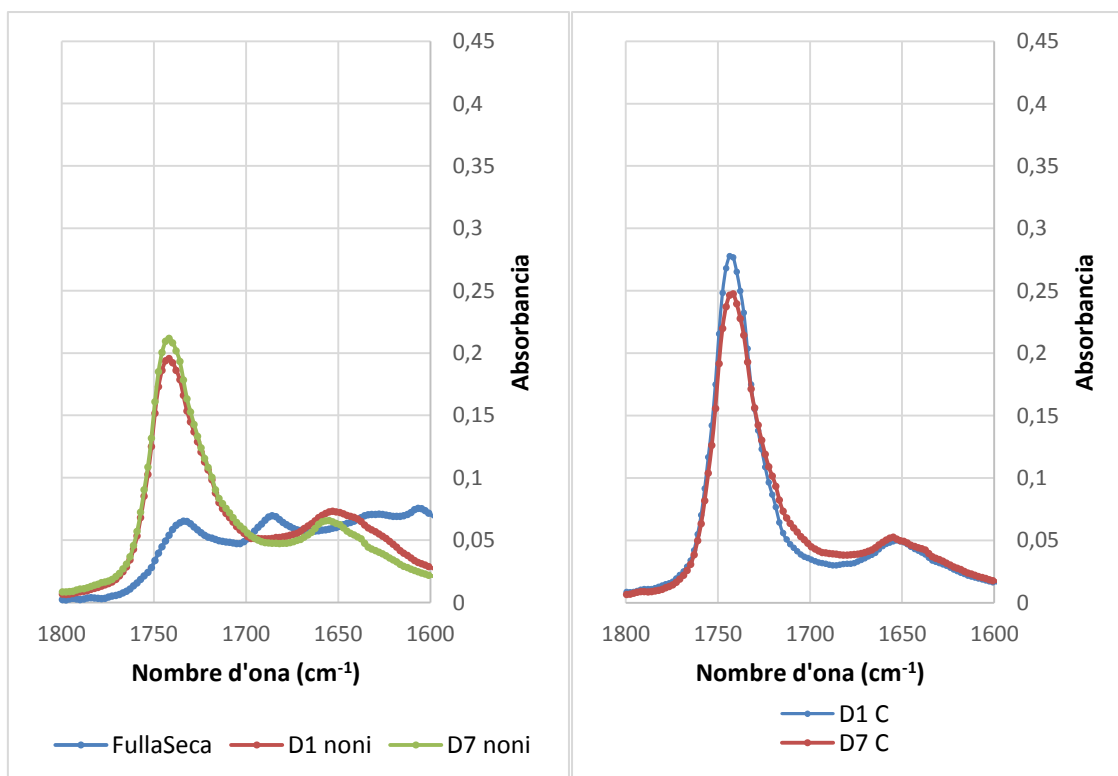


Figura 13. Espectre IR (1800-1600cm⁻¹) dels lípids extrets del filet de sardina emmagatzemats a -80°C el dia 1 del control, dia 1 del noni, el dia 7 del control i el dia 7 del noni.

Taula 16. Valors d'absorbància de les bandes 1742 i 1712 cm^{-1} de les mostres analitzades

	C=O ÈSTER (1742 cm^{-1})	C=O ÀCID (1712 cm^{-1})
Dia1 Control	0,278	0,051
Dia7 Control	0,246	0,068
Dia1 Noni	0,194	0,075
Dia7 Noni	0,209	0,079
Fulla seca	0,049	0,049

Taula 17. Valors dels increments de les bandes d'èster i àcid de les mostres analitzades

	INCREMENTS
Control C=O èster	-11,273
Noni C=O èster	No disminueix significativament
Control C=O àcid	25,413
Noni C=O àcid	5,079

Els resultats mostren com en efecte la banda de l'èster per als controls decreix degut a la destrucció d'aquests enllaços durant el procés oxidatiu. En la sardina que conté noni no s'aprecien decrements significatius. A més, la banda corresponent a l'enllaç C=O d'àcid creix molt més ràpidament en el control que la sardina que conté noni demostrant així que el noni es capaç de bloquejar l'oxidació dels greixos.

Es rellevant també destacar que la banda corresponent a l'enllaç O-H que forma una gran "panxa" entre els 3500-3000 cm^{-1} de l'espectre amb noni decreix amb el pas del temps. Aquest fet es deu a que el grup hidroxil de l'antioxidant cedeix l'hidrogen al radical peròxid dels greixos bloquejant d'aquesta manera la propagació de la reacció d'autooxidació dels greixos.

6. Cost del projecte

En el cost d'aquest projecte es tenen en compte els costos de reactius, aliments, material d'un sol ús, d'amortització dels aparells i de personal.

6.1 Reactius

El cost dels reactius es calcula com:

$$\text{Cost de reactius} = \sum \text{Cost unitari (€)} \cdot \text{núm. unitats}$$

En la taula 18 es detalla la quantitat utilitzada de tots els reactius.

Taula 18. Cost dels reactius utilitzats [23].

REACTIU	QUANTITAT	PREU UNITARI	PREU TOTAL (€)
TBA (Àcid tiobarbitúric)	1,875 g	127,33 €/100 g	2,39
Etanol	1 l	70,69 €/5 l	14,14
HCl	10,5 ml	54,53 €/2,5 l	0,23
Clorur de ferro II tetrahidratat	1,6 g	21 €/50 g	0,67
Tiocianat d'amoni	121 g	48,13 €/500 g	11,65
TCA (Àcid tricloroacètic)	75 g	87,06 €/1 kg	6,53
TOTAL			35,61

6.2 Aliments

El cost dels aliments es calcula seguint la mateixa equació que per als reactius.

A la taula 19 es descriuen les quantitats gastades dels diferents aliments emprats per a realitzar l'estudi.

Taula 19. Cost dels aliments utilitzats.

ALIMENT	QUANTITAT	PREU UNITARI	PREU TOTAL (€)
Oli de gira-sol	2 l	1,22 €/1 l	2,44
Sal	20 g	0,69 €/1 kg	0,01
Té verd	35 g	0,65 €/capsa	0,65
Sardines	930 g	6,90 €/1 kg	6,42
Vedella	1 kg	7,95 €/1 kg	7,95
TOTAL			17,47

6.3 Material

El cost del material es comptabilitza tal i com s'ha fet per als reactius, seguint la mateixa equació.

Tot seguit, a la taula 20 es mostra el resum de les quantitats de cadascun dels materials utilitzats.

Taula 20. Cost del material gastat [24].

MATERIAL	QUANTITAT	PREU UNITARI	PREU TOTAL (€)
Vials de vidre ambre 30 ml	20	22,15 €/ 110 u	4,03
Cubetes de plàstic de 4 ml PMMA	30	9,51 €/100 u	2,85
Eppendorfs 1,5 ml	230	17,14 €/1000 u	3,94
TOTAL			10,82

6.4 Amortització aparells

Per al càlcul del cost que representa la utilització dels aparells se segueix la següent equació:

$$\text{Amortització} = \frac{\text{Valor adquisició (€)}}{\text{Vida útil (anys)} \cdot \frac{365 \text{ dies}}{\text{any}}} \cdot \text{Període d'utilització (dies)}$$

A la taula 21 que es troba a continuació es detallen els dies d'ús de cadascun dels aparells.

Taula 21. Cost d'amortització dels aparells [24].

APARELL	VALOR ADQUISICIÓ (€)	VIDA ÚTIL (anys)	PERÍODE D'UTILITZACIÓ (dies)	AMORTITZACIÓ (€)
Ultra-turax	925	10	30	7,60
Balança	904,80	10	100	24,79
Estufa	1800	15	100	32,88
Espectrofotòmetre	1.200	12	100	27,40
Ultrasó	900	5	20	9,86
Bany	2.150	10	15	8,84
Vòrtex	141,78	8	30	1,46
FTIR-ATR	25.000	15	2	9,13
TOTAL				121,96

6.5 Personal

Per al càlcul de cost de personal s'ha de tenir en compte les hores treballades, el sou del treballador (SB) i el cost que té l'empresa de seguretat social (SS) de cada treballador. Per tant el cost de personal es calcula mitjançant l'expressió següent:

$$\text{Cost de personal (€)} = \left\{ RH (\text{hores} \cdot \text{persona}) \cdot SB \left(\frac{\text{euros}}{\text{hora}} \right) \right\} + SS (\text{euros})$$

Taula 22. Cost total del personal [25].

GRUP PROFESSIONAL	PERS.	RH (H/PERS.)	SB (€/H)	SB (€)	SS (€) [32% SB]	COST TOTAL (€)
Projectista	1	600	12,10	7.260	2.323,2	9.583,20
Professor	1	100	17,21	1.721	550,72	2.271,72
TOTAL						11.854,92

6.6 Total

Taula 23. Cost total del projecte

	IMPORT (€)
Reactius	35,61
Aliments	17,47
Material	10,82
Aparells	121,96
Personal	11.854,92
TOTAL	12.040,78

Per tant, el cost total del projecte és de

12.040,78€

7. Impacte ambiental

Un dels valors afegits que tenen els antioxidants naturals vers els sintètics es que minimitzen l'impacte ambiental ja que provenen del reaprofitament de residus naturals i s'evita el cost de fabricació i d'energia en el cas dels sintètics.

En la realització dels diferents experiments es generen residus ja que s'utilitzen reactius perjudicials pel medi ambient. En la taula 24 s'indica el nom del residu, l'experiment en que s'utilitza i al grup de residus al qual pertany. Un cop separats en els seus respectius dipòsits la universitat els envia a una planta de tractament de residus.

Taula 24. Separació residus generats.

RESIDU	EXPERIMENT	GRUP DE RESIDUS
Etanol	VP	Dissolvents orgànics no halogenats
Ferrocianur	Reactiu VP	Dissolvents orgànics amb metalls
Àcid clorhídric	Reactiu VP i TBARS	Dissolucions àcides
Àcid tiobarbitúric	Reactiu TBARS	Dissolucions àcides
Àcid tricloroacètic	Reactiu TBARS	Dissolucions àcides
Alúmina	Eliminació antioxidants oli	Residus olis

8. Desenvolupament temporal del treball

Taula 25. Diagrama de Gantt del treball

	S1 7-12set	S2 13-20set	S3 21-27set	S4 26-4oct	S5 5-11oct	S6 12-18oct	S7 19-25oct	S8 26-1nov	S9 2-8nov	S10 9-15nov	S11 16-22nov	S12 23-29nov	S13 30-6dec	S14 7-13dec	S15 14-20dec
M. Preparació extractes															
M. Folin, ORAC															
M. ABTS, DPPH															
Exp.3 Filtratge oli															
Exp.3 Preparació emulsions															
Exp.3 Emulsió Noni															

	S16 1-7feb	S17 8-14feb	S18 15-21feb	S19 22-28feb	S20 29-6mar	S21 7-13mar	S22 14-20mar	S23 21-27mar	S24 28-3abr	S25 4-10abr	S26 11-17abr	S27 18-24abr	S28 25-1mai	S29 2-8mai	S30 9-15mai
Exp.1 Preparació films															
Exp.1 Meat-Burg Films TBARS															
Exp.2 Meat-Burg Noni Film TBARS															
Exp.4 Fish-Burg control															
Exp.4.Fish-Burg control + green tea															
Exp.4Fish-Burg Noni															
Exp.5 Extracció de lípids															
Exp.5 IR															

Conclusions

En tots els experiments s'ha complert que la protecció de l'oxidació és proporcional a les concentracions dels antioxidants afegits.

En la quantificació de l'activitat antioxidant, l'extracte de fulla de noni de Veneçuela i el de Mèxic analitzats tenen una correlació entre els mètodes antiradicalaris i la determinació de polifenols totals. L'extracte de fulla fermentada presenta la quantitat inferior d'antioxidants en aquests mètodes, resultats que concorden amb la bibliografia.

En les emulsions o/w, l'extracte de noni al 5,8% protegeix 3 vegades més de l'oxidació que l'extracte de noni 1,5% i que la mostra control. En l'experiment en carn, el film de gelatina mostra més efectivitat que el de PLA quan se li afegeix extracte de noni. El film de gelatina-noni així com els films de PEBD protegeixen 1,7 vegades més de l'oxidació que la mostra control. Hi ha un comportament similar en l'experiment amb peix, on el noni 5% i el te verd 5% protegeixen 6 vegades més de l'oxidació que la mostra control.

L'anàlisi amb espectroscòpia infraroja demostra també com el noni protegeix la mostra front l'oxidació mitjançant l'estudi de les bandes específiques de l'espectre. El decreixement i creixement d'aquestes bandes dona també suport a l'estudi.

Les recomanacions futures per a seguir amb aquest estudi són:

Degut a que actualment la investigació científica s'està especificant en l'estudi de la cura de les malalties fóra interessant, en el cas de continuar estudiant els efectes beneficiosos de la fulla del noni, incloure un estudi de la capacitat de l'extracte per protegir les cèl·lules del nostre organisme. Per a dur-ho a terme s'analitzaria l'activitat anticancerígena de l'extracte de fulla de noni. El mètode a seguir consistiria en afegir aquest extracte a un cultiu de cèl·lules canceroses i mesurar per citometria posterior la viabilitat de les cèl·lules. La hipòtesi a verificar seria que en presència de l'extracte la mortalitat de les cèl·lules canceroses seria major.

Agraïments

Agraeixo a Maria Pilar Almajano, la meva tutora, per donar-me l'oportunitat per poder realitzar aquest projecte de fi de Grau amb ella. Gràcies per ajudar-me i ensenyar-me durant la realització dels diferents experiments i durant els dubtes i millores que han anat sorgint. Especialment agrair el fet que he pogut aprendre la feina en un laboratori i de la dedicació i esforç que es necessita.

Gràcies als meus companys de laboratori Gaby, Manel, Àngels, Camila i Martín, que durant aquests mesos sempre m'han ajudat quan he necessitat un cop de mà en el projecte.

A la meva família per donar-me suport durant tota la carrera i creure en mi durant aquesta llarga etapa.

A les meves amigues i companys de carrera per estar a prop meu en tot moment amb els quals he estudiat, rigut i passat molts bons moments.

Bibliografia

- [1] E. CONDE, M.GORDON, A.MOURE, H. DOMINGUEZ (2011). *Effects of caffeic acid and bovine serum albumin in reducing the rate of development of rancidity in oil-in-water and water-in-oil emulsions*
- [2] M.G.GALLEGO, M.H.GORDON, F.J.SEGOVIA, M.P.ALMAJANO (2015). *Caesalpinia decapetala Extracts as inhibitors of lipid oxidation in beef patties*
- [3] JAN POKORNY, NELLY YANISHLIEVA, MICHAEL H. GORDON (2001). *Antioxidants in food*. Elsevier.
- [4] A.DECKER, K.WARNER, P.RICHARDS, F.SHAHIDI (2005). *Measuring Antioxidant Effectiveness in food*
- [5] TORRE, A. D. (2004). *Noni, El árbol de la vida*.
- [6] M. LAGUERRE, J. LECOMTE, P.VILLENEUVE (2007). *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*
- [7] J. YANG *, R. P.-S. (2006). *Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (Morinda Citrifolia)*.
- [8] SHENGMIN SANG, X. C. (2001). *Flavonol Glycosides and Novel Iridoid Glycoside from the Leaves of Morinda Citrifolia*.
- [9] KOHEI KAMIYA, Y. T. (2004). *Chemical Constituents of Morinda citrifolia Fruits Inhibit Copper-Induced Low-Density Lipoprotein Oxidation*.
- [10] YIN YIN THOO, S. K. (2009). *Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (Morinda citrifolia)*.
- [11] Z. MOHD ZIN, A. A.-H. (2001). *Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root, fruit and leaf*.
- [12] Z. MOHD ZIN, A. A. (2004). *Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (Morinda citrifolia L.)*.
- [13] V.ROGINSKY, E.A.LISSI (2004). *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*.
- [14] ADRIANA BARBOSA COSTA, A. M. (2013). *Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (Morinda citrifolia L.)*.
- [15] J.T.DEL RIO (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por dpsh y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera*

- [16] YANINE CHAN-BLANCO, F. V. (2007). *The ripening and aging of noni fruits (Morinda citrifolia L.): microbiological flora and antioxidant compounds.*
- [17] BRAND-WILLIAMS W, C. M. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.*
- [18] Espectroscopia infrarroja [data de consulta: 18/04/2016] www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf
- [19] ISABEL SÁNCHEZ-ALONSO, P. C. (2011). *Vibrational spectroscopic analysis of hake lipids during frozen storage.*
- [20] La Sardina [data de consulta: 04/05/2016] (juny 2016) DONNA10 La revista de Terrassa I Matadepera
- [21] MARÍA DE LA LUZ CÁDIZ-GURREA, S. F. (2014). *Pine Bark and Green Tea Concentrated Extracts: Antioxidant activity and characterization of bioactive Compounds by HPLC.*
- [22] M.S.PAK-DEK, A.OSMAN, N.G.SAHIB, N.SAARI (2011). *Effects of extraction techniques on phenolic components and antioxidant activity of mengkudu (Morinda Citrifolia L.) leaf extracts*
- [23] PANREAC. [data de consulta: 21/03/2016] www.panreac.es
- [24] Catàleg de productes químics [data de consulta: 21/03/2016] www.labbox.com/es/productos/
- [25] Federación Empresarial de la Industria Química Española [data de consulta: 21/03/2016] <http://www.feique.org/>